

UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS COMANDANTE MANUEL FAJARDO  
INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGÍA Y RADIOBIOLOGÍA



SEGURIDAD, INMUNOGENICIDAD Y PRIMERAS EVIDENCIAS DE RESPUESTA  
ANTITUMORAL CON EL USO DE LA FORMULACIÓN VACUNAL NeuGcGM3/VSSP EN  
PACIENTES CON MELANOMA AVANZADO.

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

DRA. MARTA DE LA CARIDAD OSORIO RODRÍGUEZ

La Habana

2012

UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS COMANDANTE MANUEL FAJARDO  
INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGÍA Y RADIOBIOLOGÍA



SEGURIDAD, INMUNOGENICIDAD Y PRIMERAS EVIDENCIAS DE RESPUESTA  
ANTITUMORAL CON EL USO DE LA FORMULACIÓN VACUNAL NeuGcGM3/VSSP EN  
PACIENTES CON MELANOMA AVANZADO.

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

Autora: DRA. MARTA DE LA CARIDAD OSORIO RODRÍGUEZ

Tutora: Lic. Adriana Carr Pérez. Dra. C. Salud

La Habana

2012

## Dedicatoria

A mi abuelo José: por mostrarme el  
camino....

A mis padres: por ayudarme a  
recorrerlo

A mi esposo: por acompañarme  
siempre

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia como un todo, sin la ayuda de la cual, nada en mi vida habría sido posible.

A mi tutora, Dra. C Adriana Carr Pérez, quien dedicó buena parte de su tiempo personal para ayudarme en la confección del documento y en mi preparación científica.

A mis compañeros del INOR: Dres. Elías Gracia, Edmundo Rodríguez, Braulio Mestre, Profesor Dr. C Lorenzo Alfonso y a todo el personal de la Sala Q, quienes propiciaron en mil maneras la realización de este trabajo, largamente postergado.

A los residentes de Oncología, para la preparación de los cuales debemos ser cada día mejores y a quienes robé mucho del tiempo docente que debía haberles entregado.

Al Centro de Inmunología Molecular, colectivo que despertó en nosotros el interés por estos temas, y por la superación científica constante.

A mis pacientes, aquellos que viven y aquellos que no lograron sobrevivir, por el incentivo científico que representan cada día en nuestra vida profesional.

**¡GRACIAS!**

## SEGURIDAD, INMUNOGENICIDAD Y PRIMERAS EVIDENCIAS DE RESPUESTA ANTITUMORAL CON EL USO DE LA FORMULACION VACUNAL NeuGcGM3/VSSP EN PACIENTES CON MELANOMA AVANZADO

Autora: Dra. Marta de la Caridad Osorio Rodríguez

Tutora: Dra. C. Salud Adriana Carr Pérez

### SINTESES

**Introducción.** El melanoma es considerado hoy una epidemia a nivel mundial. Su alta letalidad, constituye un serio problema a pesar de los continuos avances farmacológicos y tecnológicos. NeuGcGM3/VSSP es una formulación vacunal que contiene el gangliósido NeuGcGM3 incorporado en el CPME de *Neisseria meningitidis*. Puede ser una opción terapéutica dadas la expresión de este gangliósido en el melanoma primario y la inmunogenicidad y seguridad demostradas por esta vacuna en el cáncer de mama avanzado. En este estudio se evaluó la seguridad, inmunogenicidad y la respuesta antitumoral en pacientes con melanoma avanzado al administrarla por las vías IM o SC. **Material y métodos:** Se identificó la expresión del gangliósido en los melanomas primarios y sus metástasis por métodos de Inmunohistoquímica con el AcM 14F7 (anti-NGCGM3). Se realizaron 2 ensayos clínicos Fase Ib/IIa de escalado de dosis con NeuGcGM3 /VSSP en pacientes con melanoma avanzado por las vías IM y SC. La seguridad y la respuesta antitumoral se evaluaron con los criterios CTC y RECIST. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS. **Resultados:** NeuGcGM3 se expresó en los tumores primarios y en las metástasis ganglionares estudiadas. NeuGcGM3/VSSP fue segura administrada por las vías SC e IM, sin toxicidad limitante. Resultó inmunogénica con respuesta de anticuerpos de isotipo IgM e IgG en el 75 % los pacientes. Hubo respuesta antitumoral en el 38.5% de éstos con incremento de la mediana de SV asociada principalmente a la respuesta antitumoral. La aparición de vitiligo y la respuesta de anticuerpos contra otros gangliósidos no presentes en la formulación vacunal pudiera considerarse una manifestación de restauración inmunológica. **Conclusiones.** NeuGcGM3/VSSP administrada IM y SC en

pacientes con melanoma avanzado fue segura, inmunogénica y con actividad antitumoral asociada a ventajas en la supervivencia global.

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO	9
CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS	36
CAPÍTULO 3. EXPRESIÓN DEL GANGLIÓSIDO NeuGcGM3 EN TUMORES PRIMARIOS Y EN METÁSTASIS DE PACIENTES CON MELANOMA	49
CAPÍTULO 4. ENSAYO CLINICO FASE Ib/IIa CON LA FORMULACIÓN VACUNAL NeuGcGM3/VSSP /MONTANIDE ISA 51 POR LA VÍA IM EN PACIENTES CON MELANOMA AVANZADO CUTÁNEO Y OCULAR	54
CAPÍTULO 5. ENSAYO CLÍNICO FASE IB/IIA CON LA FORMULACIÓN VACUNAL NeuGcGM3/VSSP ADMINISTRADA POR LA VÍA SUBCUTÁNEA EN PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO AVANZADO	67
CAPÍTULO 6. EVIDENCIAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO INMUNIZADOS CON NeuGcGM3/VSSP. REPORTES DE CASOS.	81
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	94
CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXOS	

GLOSARIO DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.

AcM	Anticuerpo monoclonal
Acs	Anticuerpos
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
AJCC	Comité Americano de unión en cáncer. Por sus siglas en inglés; <i>American Joint Comitee on Cancer</i>
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica. Por sus siglas en inglés; <i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATA	Antígenos tumor asociados
ATE	Antígenos tumor específicos
BAAF	Biopsia aspirativa por aguja fina
BCG	Bacilo Calmette Guerin
BPC	Buenas Prácticas Clínicas
BRAF	Oncogen codificador de tirosina- kinasa serina-treonina B Raf
CDC	Citotoxicidad mediada por complemento
CECMED	Centro Estatal de Control de los Medicamentos
CENCEC	Centro Nacional Coordinador de Ensayos clínicos
CRD	Cuaderno de Recogida de Datos
CIM	Centro de Inmunología Molecular
CMP	Citidin Monofosfato hidroxilasa
CIMEQ	Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas
CPME	Complejo de Proteínas de membrana externa
CTC	Criterios Comunes de Toxicidad. Por sus siglas en inglés; <i>Common Toxicity Criteria</i>
DMT	Dosis máxima tolerable
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DTIC	Dacarbazina
EAs	Eventos adversos
EC	Ensayo Clínico
ECOG	Grupo cooperative del este de los EEUU. Por sus siglas en inglés; <i>East Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	<i>Enzimed-linked immunosorbent assay</i> (sin traducción encontrada)
EMA	Agencia Europea de medicamentos en inglés; <i>European Medicine Agency</i>
FDA	Agencia norteamericana de alimentos y drogas del inglés; <i>Food and Drug Administration.</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias hematopoyéticas de granulocitos y macrófagos. Por sus siglas en inglés: <u><i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i></u>
G-CSF	Factor estimulante de colonias hematopoyéticas de granulocitos. <i>Por sus siglas en inglés: <u>Granulocyte Colony Stimulating Factor</u></i>
HD	Antígeno Hanganutzii-Deicher
HHA	Hospital Hermanos Ameijeiras
HLA	Antígeno leucocitario humano del inglés: <u><i>human leukocyte antigen</i></u>
HUD	Hospital Universitario Docente
ICH	Conferencia internacional de armonización del inglés <i>International Conference of Harmonisation</i>



IDO	Enzima indolamino 2,3 deoxigenasa
IFN $\alpha$ rec	Interferón alfa recombinante (se referirá siempre como IFN)
IFN $\gamma$	Interferón Gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-2 rec	Interleukina -2 recombinante
IM	Intramuscular
INOR	Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
KLH	<i>Keyhole Lynpet Hemocianine</i> (sin traducción encontrada)
LDH	Deshidrogenasa láctica
LSD	Lóbulo superior derecho pulmonar
M1	Metástasis a distancia
MII	Miembro inferior izquierdo
MITF	Oncogén específico de melanoma. Del inglés: <i>Microftalmia-associated Transcription Factor</i>
NCCN	Red Nacional integral de Cáncer. Guías para la práctica clínica en Oncología. Del inglés: <i>National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology</i> .
NeuGcGM3	Gangliósido N glicolil GM3
NeuAcGM2	Gangliósido N acetil GM2
NeuAcGM3	Gangliósido N acetil GM3
NK	Células asesinas naturales. Del inglés; <i>Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACEC	Programa de aseguramiento de la calidad de los Ensayos clínicos
PD-1	Receptor de muerte programada 1 . Del inglés; <i>Programed Death receptor-1</i>
PET	Tomografía de emisión de positrones. Del inglés; <i>Positron Emission Tomography</i>
RAS	Oncogen
RC	Respuesta Completa
RP	Respuesta Parcial
EE	Enfermedad Estable
RECIST	Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos. Del inglés: <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
REMS	Estrategia de mitigación de riesgos. Del inglés: <i>Risk- Events Mitigation Strategy</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNC	Registro Nacional del Cáncer
SC	Subcutáneo
SEER	Programa de vigilancia, Epidemiología y resultados finales de los EE.UU. Del inglés <i>Surveillance EE.. Program in Epidemiology and Final Results</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SV	Supervivencia
TA	Temperatura ambiente
TAC	Tomografía axial computarizada
TBS	Tris Buffer salino
TCS	Tejido celular subcutáneo

TCD4+	Linfocito T CD4
TCD8+	Linfocito T CD8
TGP	Transaminasa Glutámico-Pirúvica
TGO	Transaminasa Glutámico Oxalacética
Th1	Patrón de respuesta T auxiliadora tipo 1
Th2	Patrón de respuesta T auxiliadora tipo 2
TIL	Linfocitos T infiltrantes
TMZ	Temozolomida
TNM	Sistema de estadificación de los tumores malignos
Tregs	Células T reguladoras
VEGF	Factor estimulante de endotelio vascular del inglés; <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad. Del inglés: <i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VNME	Vesículas naturales de membrana externa
VSSP	Proteoliposomas de muy pequeño tamaño del inglés; <i>Very Small Size Proteins</i>

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes.

El melanoma maligno es una de las 3 variantes de cáncer de piel cuya dramática situación epidemiológica se caracteriza como de epidemia, debido a los incrementos estables y mantenidos en su incidencia en las últimas décadas (De Vries y cols., 2006; Geller y cols., 2007). El programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales de los Estados Unidos (EE.UU.) (por sus siglas en Inglés SEER) reportó un incremento del 690 % respecto al número de casos diagnosticados desde los años 1950 al 2010 (SEER, 2011). Los avances obtenidos con las estrategias de prevención y el diagnóstico precoz no han podido cambiar el panorama de la enfermedad, de conocida agresividad, que lo sitúa como un problema de salud a nivel mundial (Rigel y cols., 2010; Jemal y cols., 2010; Spiegel y cols., 2012). Este tumor afecta generalmente a individuos durante la vida activa, (edad media de 45 años), al menos una o dos décadas antes que los principales tumores sólidos (mama, colon, pulmón y próstata) ( Erdel y cols., 2010). En Cuba, de acuerdo a los datos del Registro Nacional de Cáncer (RNC), no constituye un problema de salud, sin embargo, es parte cualitativamente importante de la actividad oncológica. En el período 2004-2006 se reportó al Registro Nacional del Cáncer de Cuba (RNC) un total de 181 casos que representaron una tasa ajustada de 1.0 x 100,000 habitantes sin diferencias en cuanto al sexo.

El melanoma en estadios tempranos y tratado adecuadamente con cirugía, presenta excelentes resultados que posibilitan cerca del 90% de curaciones, en comparación con la supervivencia (SV) a 5 años del paciente con enfermedad diseminada a los ganglios regionales, donde alcanza apenas el 54%. Para la enfermedad metastásica la cifra se reduce al 5%, lo que se traduce en una expectativa de vida entre 6 y 9 meses (Balch y cols., 2009). El tratamiento sistémico del melanoma metastásico es considerado aún hoy ineficaz. No existe una recomendación terapéutica única y estándar. Hay consenso general en que estos pacientes deben ser tratados

en el marco de un ensayo clínico, dada la ausencia de tratamientos que combinen efectividad con escasa toxicidad (NCCN, Clinical Practice Guidelines in Oncology versión 3 para melanoma, 2012) (National Cancer Comprehensive Network, por sus siglas en inglés). En aquellos con enfermedad diseminada, la presencia de metástasis en el Sistema Nervioso Central (SNC) es la situación clínica que determina cambios importantes en el tratamiento debido a su mal pronóstico y por ende, reducida expectativa de vida. La Dacarbazina (DTIC), un agente alquilante, se registró en 1975 por la *Food and Drug Administration*, (FDA por sus siglas en inglés) como tratamiento de la enfermedad avanzada a pesar de producir respuestas en menos del 20% de los pacientes tratados (Lui y cols., 2007). Este medicamento constituye el patrón de comparación para nuevos fármacos, ya que ninguno en monoquimioterapia ha demostrado mejores resultados. La Poliquimioterapia con DTIC, Temozolomida, Vinblastina, Paclitaxel con o sin sales de platino, en los regímenes habituales, produce respuestas objetivas en el 20-30% de los pacientes, sin resultados válidos en cuanto a la SV global (Chapman y cols., 1999). La Bioquimioterapia, que combina fármacos citotóxicos con inmunomoduladores como Interleukina-2 recombinante (IL-2) y el Interferón recombinante alfa 2b (IFN), produce un aumento de respuestas objetivas con toxicidad elevada de grado III-IV sin incrementos significativos de la SV libre de progresión o global (Sasse y cols., 2007).

El melanoma y el carcinoma renal son los tumores más inmunogénicos conocidos y se consideran modelos adecuados para la Inmunoterapia (de Vita y cols., 2008). Las células de melanoma difieren antigénicamente del melanocito normal, lo que permite su reconocimiento por el sistema inmune y el desarrollo de una respuesta antígeno-anticuerpo capaz de destruir el tumor o disminuir al menos su tasa de crecimiento (Kirkwood y cols., 2008; Grotz y cols., 2012). Sin embargo, ninguna inmunoterapia representa la solución definitiva para los pacientes con melanoma metastásico. Entre los productos más conocidos se encuentran el Bacilo Calmette Guérin, (BCG) y el IFN tanto en su forma farmacéutica habitual como pegilada. La utilidad de

ambos se limita al tratamiento adyuvante en la enfermedad loco regional, porque producen aumento en la SV libre de progresión, pero no en la SV global de los pacientes tratados. No se recomiendan en la enfermedad metastásica (Tan, 1993; Eggermont y cols., 2008; Herndon, 2012). La única inmunoterapia aprobada por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico hasta el año 2011 fue la IL-2 (Proleukin, Aldesleukin; Prometheus Laboratories Inc, San Diego, California), fármaco que produce un bajo índice de respuestas completas pero de larga duración. Administrada a altas dosis, resulta un tratamiento altamente tóxico que requiere experticia en su administración y cuidados especiales. (Atkins, y cols., 1999). Otra variante de inmunoterapia aprobada por la FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico es el Ipilimumab (Yervoy® de Bristol- Myers Squibb), AcM dirigido al punto de control inmune del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA 4 immune check point, en inglés), fármaco que mostró respuestas objetivas aún en pacientes con progresión tumoral durante el tratamiento sistémico (Hodi y cols., 2010; FDA News events, 2011). Su alta toxicidad limita su utilización y el completamiento de la terapéutica, lo que hace necesaria la aplicación de programas de reducción de riesgos (Hodi y cols., 2010; Robert y cols., 2011, FDA Safety Alerts for Medical Products: Yervoy, 2012). El Vemurafenib, (Zelboraf® de Genentech) es un inhibidor selectivo de BRAF, diseñado para el tratamiento de pacientes con melanoma que exprese la mutación V600E (el 50% de los casos) en el gen que codifica para esta proteína. Su aprobación en agosto del propio 2011 se basó en las tasas de respuesta obtenidas, la SV libre de progresión y la SV global, aunque el tipo de toxicidad que produce y la corta duración de la respuesta antitumoral no lo hacen un tratamiento óptimo (Fisher y cols., 2010; Chapman y cols., 2011,2012). Otra variante de inmunoterapia más selectiva y menos accesible para pacientes con melanoma en etapa avanzada o metastásica pero útil, es la transferencia adoptiva de TIL (linfocitos tumor infiltrantes activados con IL-2) del inglés: IL-2 activated-tumor-infiltrating lymphocytes. Asociada a altas dosis de IL-2 en bolo, produce resultados favorables. Es una terapéutica técnicamente costosa, que

requiere que los pacientes posean capacidad funcional excelente, ausencia de co-morbilidades y centros de investigación y personal con alta preparación (Dudley y cols., 2008; Rosenberg y cols., 2011). La bioterapia con los pequeños inhibidores de tirosina – quinasa Imatinib, Sunitinib y Dasatinib, está dirigida a la minoría de pacientes con melanoma de mucosas y melanoma acral y solar que expresen mutaciones del gen c-kit (Guo y cols., 2011).

La inmunoterapia activa específica con vacunas es un tema intensamente explorado en los últimos 20 años que persigue el control de la enfermedad a través de la intervención del sistema inmune del individuo. En general, la evaluación de su verdadero papel en el melanoma es difícil aún debido a que los resultados alentadores de pequeños estudios Fase I-II con pocos pacientes y evidentemente muy seleccionados, no son reproducibles en los estudios aleatorizados (Melanoma vaccines, 2011). Hasta el momento, en el caso del Melanoma ninguna vacuna ha demostrado evidencias sólidas de incrementos de la SV global ni de la SV libre de progresión en los ensayos clínicos Fase III, por lo que no han logrado un registro para el tratamiento de esta enfermedad (Zarour y cols., 2003; Morton y cols., 2007; Rosenthal y cols., 2008; Kirkwood y cols., 2009).

Desde 1990, el grupo de Bioquímica del INOR y posteriormente el Centro de Inmunología Molecular (CIM) investigaron la caracterización bioquímica de antígenos (Ags) tumorales de origen glicolipídico, específicamente gangliósidos, para ser utilizados en la inmunoterapia del cáncer, particularmente el cáncer de mama. Con este fin, desarrollaron el preparado vacunal con el gangliósido NeuGcGM3 incorporado hidrofóticamente al complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, en forma de proteoliposomas de muy pequeño tamaño (VSSP), (del inglés very small size proteoliposome) (Estévez y cols., 2000), el cual puede o no estar asociado a un adyuvante oleoso comercial, el Montanide ISA 51 (Seppic, Paris, Francia). NeuGcGM3, de naturaleza heterófila no está expresado en los tejidos normales

humanos y sí en algunos tumores (Leeden y Yu ,1976; Carr y cols., 2000). Este gangliósido resulta de interés como diana para la inmunoterapia de cáncer, si se tienen en cuenta su reconocimiento como antígeno tumor asociado y las evidencias experimentales que sustentan esta posibilidad terapéutica en el melanoma (Pourtokalian y cols., 1991; Carr y cols., 2000). Mc Kallip en 1999 señaló el papel inmunosupresor de los gangliósidos liberados en el microambiente tumoral por diferentes tumores y los caracterizó como potentes factores en la promoción y progresión tumoral. Diferentes estudios los identifican como inhibidores de múltiples pasos de la respuesta inmune celular (Mc Kallip y cols., 1999). De León por su parte, describió el papel del gangliósido NeuGcGM3 libre como promotor del crecimiento tumoral y su efecto inmunosupresor en linfocitos T CD4+ humanos y de ratón. (De León y cols., 2006). Todo lo anterior permitió pensar que la inmunización con una formulación vacunal que contenga este antígeno (gangliósido NeuGcGM3) y que desarrolle la inmunogenicidad necesaria, sería capaz de reducir los volúmenes de estas moléculas e inducir una respuesta antitumoral en pacientes con melanoma avanzado. Los resultados preclínicos con NeuGcGM3/VSSP indicaron que su efecto antitumoral requiere de la expresión del gangliósido en las células tumorales y que su mecanismo de acción depende de la acción de las células asesinas naturales NK (del inglés: natural killer) y de linfocitos T CD8+ (Labrada y cols., 2010). Esta vacuna se utilizó previamente en un ensayo clínico Fase I en pacientes con cáncer de mama etapas III-IV, donde demostró inmunogenicidad y muy baja toxicidad (Carr y cols., 2003). Los resultados de la respuesta inmune humoral mayoritaria IgG1 e IgG3 en los pacientes vacunados, indicaron la presencia de un patrón de respuesta Th1 (células T auxiliaoras productoras de INF  $\gamma$  y de respuesta celular). Ante las evidencias preliminares que mostró este gangliósido como posible blanco para la inmunoterapia en los melanomas, se decidió explorar esta posibilidad con la formulación NeuGcGM3/VSSP en el tratamiento de pacientes con esta enfermedad en etapas avanzada y metastásica.



## 1. 2. Hipótesis de trabajo:

La administración de la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP a pacientes con melanoma avanzado y metastásico es segura e inmunogénica cuando se administra por las vías IM o SC y es capaz de generar evidencias de respuesta clínica.

## 1.3. Objetivos

1. Determinar la expresión del gangliósido NeuGcGM3 en tumores primarios y metástasis de pacientes con melanoma cutáneo y ocular.
2. Evaluar la seguridad del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP al administrarlo por vía IM o SC.
3. Determinar la inmunogenicidad del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP al administrarlo por las vías IM y SC.
4. Evaluar las evidencias de respuesta clínica con el uso de la formulación NeuGcGM3/VSSP por las dos vías de administración.

## 1.4 Tareas

Objetivo 1. Determinar la expresión del gangliósido NeuGcGM3 en tumores primarios y metástasis de pacientes con melanoma cutáneo y ocular.

Tareas.

- Evaluación de la expresión del gangliósido NGcGM3 en el melanoma primario y sus metástasis por medio del reconocimiento con el AcM específico 14F7.

Objetivo 2. Evaluar la toxicidad del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP al administrarlo por las vías IM o SC.

## Tareas

- Evaluación de la seguridad de la formulación vacunal NeuGcGM3/VSSP por la vía IM adyuvada con Montanide ISA 51 en dos niveles de dosis: 200µg y 400 µg y establecimiento de la dosis máxima tolerable (DMT) para esta vía de administración.
- Evaluación de la seguridad del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP por la vía SC en los niveles de dosis de 0, 150; 300; 600; 900; 1,200 y 1,500 µg y establecimiento de la DMT para esta vía.

Objetivo 3. Determinar la inmunogenicidad del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP al administrarlo por las vías IM y SC

## Tarea.

- Estudio de la inmunogenicidad de la formulación vacunal NeuGcGM3 /VSSP al administrarla por las vías IM y SC en los diferentes niveles de dosis planteados.

Objetivo 4. Evaluar las evidencias de respuesta clínica con el uso de la formulación NeuGcGM3/VSSP por las dos vías de administración

## Tarea

- Identificación y caracterización de evidencias de respuesta clínica en los pacientes tratados por ambas vías de administración.

## 1.5. Estrategia de la investigación:

Se realizaron técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) en las biopsias obtenidas de los pacientes, con el Anticuerpo Monoclonal (AcM) IgG1 murino 14F7 para determinar la expresión de NeuGcGM3 en el tumor primario y las metástasis. La evaluación de la seguridad de la formulación vacunal, su inmunogenicidad y la detección de actividad antitumoral se realizaron a través de dos ensayos clínicos Fase Ib/IIa: el primero, con el preparado vacunal adyuvado con

Montanide ISA 51 y administrado por la vía IM y en el segundo, administrado por la vía SC y sin adyuvante. Las primeras evidencias de respuesta clínica observadas en los pacientes estudiados se presentaron en forma de tasas de respuestas, curvas de Kaplan Meier y reportes de casos clínicos.

#### 1.6. Novedad Científica:

En este trabajo se exponen las experiencias de la aplicación por primera vez de la formulación vacunal NeuGcGM3 /VSSP en pacientes con melanoma cutáneo y ocular avanzado o metastásico. En él se demuestra la seguridad, la inmunogenicidad y las primeras evidencias de respuesta antitumoral en este tipo de pacientes, además de la expresión del gangliósido NeuGcGM3 en las metástasis loco regionales de los melanomas cutáneos, lo que hace pensar en su posible utilización como blanco para la inmunoterapia activa específica en este tumor.

#### 1.7. Aporte al conocimiento.

El gangliósido NeuGcGM3 en un contexto altamente inmunogénico (estimulación del sistema inmune innato por la presencia de una nanopartícula con señales de proteínas de la *Neisseria meningitidis*) muestra las primeras evidencias de efecto antitumoral y de incremento de la supervivencia en un subgrupo de pacientes con melanoma avanzado irresecable o metastásico.

#### 1.8. Presentaciones previas del tema de investigación.

Resultados parciales de este estudio han sido objeto de presentación en cinco eventos científicos en el extranjero y doce de carácter nacional. El tema y los resultados que forman parte de la tesis han sido objeto de tres publicaciones en revistas extranjeras y una nacional y existen además dos artículos en preparación. Este tema forma parte del Proyecto Nacional de Vacunas Terapéuticas en Cáncer de la Academia de Ciencias de Cuba.

## CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO

## CAPITULO 1. MARCO TEORICO

El melanoma es una neoplasia originada por la transformación maligna de los melanocitos, células encargadas de la producción de la melanina, pigmento fotoprotector que confiere su color característico a la piel humana. Durante el primer trimestre de la vida fetal, los precursores de estas células asientan en la cresta neural para después migrar hacia la piel, meninges, membranas mucosas, esófago cervical y ojo. De aquí, se infieren las diferentes localizaciones en que puede desarrollarse este tumor, fundamentalmente cutáneo en el 91.5% (Chang y cols, 1998). Es una neoplasia en la que se invocan como factores etiológicos fundamentales la agresión externa por la luz solar, los agentes inmunosupresores y las alteraciones de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular en el melanocito, unido esto a fallos en la destrucción de células con daño en el DNA que son capaces de multiplicarse y evadir los mecanismos normales de control (Thompson y cols., 2004).

### 1.1 Epidemiología del melanoma cutáneo.

El nuevo milenio ha traído cambios en la incidencia y mortalidad por esta enfermedad. El melanoma constituye un importante problema de salud en nuestra época, que hace a muchos catalogarlo como una verdadera epidemia. La incidencia más alta se observa en Australia, 36.1 x 100,000 habitantes en hombres y 25,7 x 100,000 en mujeres. Las tasas más bajas se encuentran en países asiáticos con tasa cercana o inferior a 0,5 x 100,00 habitantes (Globocan 1). Cuba, según datos del RNC, presenta una tasa ajustada de 1.1 / 100,000 habitantes (RNC de Cuba, trienio 2006- 2008) sin marcadas diferencias en cuanto al sexo. No representa un problema de salud, pero la potencial letalidad de este tumor aún en sus etapas iniciales y los pésimos resultados terapéuticos que caracterizan a la enfermedad avanzada, lo distinguen entre los demás tumores sólidos (Ascierto y cols., 2012). Dos tipos de factores se consideran relevantes en la etiopatogenia: **ambientales**, entre los que la exposición solar es el más notable,

y aquellos **dependientes del huésped**, como son la pigmentación de la piel, la reactividad de la misma frente a la luz solar y los factores ligados a la herencia. El melanoma es esencialmente una enfermedad de individuos de piel blanca, (aunque puede aparecer en cualquier grupo étnico) susceptible a los efectos nocivos de la radiación UV de la luz solar. La relación entre exposición y riesgo de melanoma no es perfecta debido a que existen factores de susceptibilidad individual en el huésped. Se invoca como importante la protección desde la niñez para prevenir la iniciación del proceso de carcinogénesis y la progresión del melanoma ya establecido (Grandini y cols., 2005; Geller y cols., 2007). El melanoma familiar (12%) a diferencia del anterior, se caracteriza por el aumento del riesgo de desarrollar melanomas primarios, la alta incidencia de melanomas múltiples en el mismo individuo y la temprana edad de inicio de la enfermedad. En estos casos se reporta como anomalía genética precursora la presencia de mutaciones de los genes supresores CDKN2A y CDK4 que intervienen en la regulación del ciclo celular (Goldstein y cols., 1998).

## 1.2 Algunos aspectos de la biología molecular del melanoma cutáneo.

La identificación de alteraciones genéticas en el melanoma persigue identificar marcadores moleculares de la patogénesis y la progresión de esta enfermedad, además de proporcionar “blancos” para las intervenciones terapéuticas (Chin y cols, 2006). A continuación nos referiremos a las más importantes descritas para este tumor.

### CDKN2A

Más del 70% de los melanomas familiares presentan alteraciones en este gen supresor, presente en el cromosoma 9p21. Permite la transcripción de los productos de genes supresores p<sup>16</sup>INK4A y p<sup>19</sup>ARF (Molven y cols., 2005) cuya pérdida por mutación germinal da lugar a la inactivación de 2 importantes vías supresoras de tumores: El gen del retinoblastoma (RB) y el

gen P53. Este cambio favorece la inmortalidad celular y conlleva al resto de los eventos que caracterizan a la tumorigénesis (Bardessy y cols., 2001).

#### CDK4

Es el blanco de inhibición del  $p^{16INK4A}$  y éste a su vez regula la activación del gen del RB por lo que su inhibición puede dar lugar a la melanogénesis (Molven y cols., 2005).

#### *Vía del RB*

Este gen es el responsable de prevenir la entrada incorrecta de las células al ciclo celular. Su pérdida heterocigótica germinal es la responsable de la aparición de melanomas. Los pacientes sobrevivientes de retinoblastoma bilateral tienen una predisposición al desarrollo de melanomas en un rango entre 4 a 80 veces mayor que la población normal (Bardessy y cols., 2001).

#### *Vía del p53*

P53 es un gen supresor de tumores vital en el mantenimiento del genoma al permitir la reparación del material genético, la regulación de los puntos de control del ciclo celular y la apropiada inducción de la apoptosis. Es importante en la presencia de resistencia tumoral a fármacos antineoplásicos. Su inactivación está presente en más del 50% de los tumores sólidos en humanos. La cooperación de este gen con el H-Ras activado se reconoce como inductora de melanomas (Soengas y cols., 2003).

#### *Vía de las MAP kinasas.*

Se encuentra hiperactivada en los melanomas debido a mutaciones en genes que integran la cascada; entre ellos NRAS y BRAF. La fosforilación de las proteínas MEK y ERK como consecuencia de los eventos que ocurren en la cascada de activación, constituye el punto focal para los cambios en la proliferación, diferenciación celular y la senescencia. La vía MAP se

interrelaciona con la vía de P13K, importante también en la melanogénesis (Goel y cols., 2006; Yahima y cols., 2012).

Vía P13K.

Esta vía se activa por la pérdida del gen supresor PTEN. Su importancia radica en que activa en la cascada al gen de supervivencia y proliferación AKT y éste a su vez a MTOR, conocido por su intervención en el crecimiento celular (Goel y cols., 2006).

PTEN

Es un gen supresor presente en el cromosoma 10q. Su pérdida se detecta en el 40% de los melanomas, asociado a otras mutaciones como las del BRAF (Goel y cols., 2006)

BRAF

Las mutaciones somáticas de este gen están presentes con alta frecuencia en el melanoma. Se deben al cambio de una molécula de valina por ácido glutámico en los nucleótidos (Mutación V600E) y se localizan en áreas cutáneas expuestas intermitentemente a la radiación solar. Aquellas con intensa exposición suelen presentar la mutación de tipo "salvaje" (*wild type* en inglés). BRAF es el blanco inmediato inferior en la cascada de la familia del gen RAS y como tal participa en la activación de MEK y ERK. Se requieren interrelaciones entre diversos genes para la inducción de la melanogénesis con la intervención del BRAF (Curtin, Fridlyand y Kageshita, 2005; Patton, Widlund y Kutok, 2005; Yahima y cols., 2012).

c-KIT

Este gen juega un papel importante en el desarrollo del melanocito. La pérdida de su expresión se vincula con la progresión del melanoma primario a metastásico. Las mutaciones puntuales de este gen se relacionan con la aparición de melanoma de mucosas, melanoma acral y el



melanoma desarrollado en la piel crónicamente dañada por la radiación solar (Zhu y Fitzpatrick, 2006).

Vía del MITF (*del inglés: Microftalmia-associated Transcription Factor*). (*Oncogen específico de melanoma*)

La expresión de este gen resulta muy importante para la pigmentación, proliferación y supervivencia del melanocito normal. Su amplificación según estudios de hibridación in situ está presente en casi el 20% de los melanomas metastásicos y esto se relaciona con baja supervivencia de los pacientes a 5 años de acuerdo al análisis de las curvas de Kaplan Meier. Resulta un gen integrador en la melanogénesis. Dirige la expresión de muchos otros genes relacionados con la supervivencia y proliferación del melanocito. Se encuentra íntimamente relacionado en la cascada con otros genes como BRAF, INK4A, y CDK y se activa por la intervención de c-KIT y las vías de señalización de MAPK (Khaled y cols., 2003).

### 1.3 Diagnóstico y estadificación del melanoma cutáneo.

El diagnóstico del melanoma es inicialmente clínico, prácticamente el 90% de las lesiones pueden diagnosticarse así (Rigel y cols., 2010). Los éxitos actuales en materia de diagnóstico precoz se basan en el auto examen detallado y la biopsia dirigida de lesiones sospechosas, que permite diagnosticar la enfermedad en estadios donde la cirugía es el tratamiento curativo. El paciente evidencia más signos que síntomas, como son: cambios de coloración en lesiones previas, elevación, ulceración y sangrado de una lesión pigmentada. Entre el 30 al 70% de los melanomas se asienta en piel sana (de Vita y cols., 2008). El uso de los dermatoscopios o microscopios epiluminiscentes facilita la evaluación de las lesiones en cuanto a Asimetría, Bordes, Color, Diámetro, y Elevación. (Sistema ABCD de Rigel). La clasificación clínica, que no se corresponde con el comportamiento biológico y el pronóstico, contempla 5 tipos fundamentales (Rigel y cols., 2010)

- Melanoma de diseminación superficial (70% de los casos)

Aparece en cualquier zona del cuerpo, puede desarrollarse en un nevo pre-existente, consiste en una placa de bordes irregulares y pigmentación variable.

- Melanoma nodular.(15% )

Aspecto de nódulo con relativa simetría pero variabilidad en el color, desde el negro hasta lesiones amelánicas. Se ulcera frecuentemente y sangra con facilidad.

- Melanoma acral lentiginoso. (10%)

Aparece en palmas de manos y plantas de pies, mucosas y regiones subungueales. Afecta todas las etnias. Inicialmente es una mácula que se convierte progresivamente en pápula, Suele confundirse con lesiones traumáticas o de carácter inflamatorio.

- Melanoma Lentigo Maligno. (5%)

Lesión de color oscuro que aparece en ancianos con exposición crónica al sol, en la piel de la cara. La lesión precursora es la llamada “peca de Hutchinson”.

- Melanoma Desmoplásico (menos del 2%)

Descrito en 1971, asienta en lesiones que pueden ser pigmentadas o no. Suele confundirse con cicatrices, fibromas de la piel o con el carcinoma basal. Afecta a individuos de la tercera edad, y se caracteriza por la alta frecuencia de recidivas locales y la invasión de nervios periféricos (Neurotropismo). No suele diseminarse por vía linfática. El diagnóstico por técnicas de Inmunohistoquímica permite el diagnóstico diferencial con sarcomas, cicatrices u otras lesiones. (Chen y cols., 2008).

El melanoma causa metástasis con mayor frecuencia en pulmones, hígado, cerebro y ganglios linfáticos. No obstante, cualquier sitio visceral puede encontrarse involucrado incluidos el corazón, glándulas suprarrenales, bazo, hueso, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario,

pleura, etc. La evaluación comprende desde los estudios imagenológicos habituales, la Resonancia Magnética (RM) en busca de lesiones metastásicas en el sistema nervioso central hasta la Tomografía por emisión de positrones con fusión de imágenes de TAC (PET/CT) usando fluor-18 deoxiglucosa, estudio que si bien no es completamente útil en la evaluación de los melanomas en estadios iniciales, sí lo es para evaluar al paciente de cuerpo entero y decidir la posibilidad de la cirugía en estadios avanzados de la enfermedad (Schroer – Gunther y cols., 2012; Bronstein y cols., 2012). Las investigaciones en pacientes con melanoma deben indicarse racionalmente de acuerdo a la sintomatología expresada por el enfermo y los hallazgos del examen físico con vistas a evitar estudios costosos, excesivos e innecesarios (Miranda y cols., 2004). El sistema de estadificación utilizado en esta enfermedad es el (pTNM) del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (anexo 1) Esta clasificación permite, como en la mayoría de las localizaciones de cáncer, seleccionar el tratamiento apropiado para cada estadio clínico de la enfermedad de acuerdo a factores dependientes del tumor y del paciente, considerados *predictores* de supervivencia. Este sistema fue objeto de una revisión en base a datos aportados por el análisis de 17,600 pacientes con diagnóstico de melanoma y todos los factores pronósticos (Balch y cols., 2001), lo que dio lugar a una nueva versión de esta clasificación, que se actualiza periódicamente (Balch y cols., 2009). El análisis multivariado en pacientes con melanoma localizado (Estadios I y II) considera como factores pronósticos de primera importancia el grosor y la ulceración del tumor y entre otros, la edad, el sexo, el sitio anatómico de la lesión, el histotipo de melanoma, el nivel de invasión de la lesión (Nivel de Clark) y el patrón de crecimiento del tumor. La versión más reciente de este sistema considera como un factor pronóstico adicional el número de mitosis por  $\text{mm}^3$  (Melanoma Staging 2010). En el caso del melanoma diseminado a los ganglios regionales (Estadio III), el número de ganglios metastásicos, la presencia de lesiones en tránsito y la extensión extracapsular caracterizan la etapa y predicen la supervivencia a cinco años, mientras que en la etapa IV los predictores son

los valores de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y el sitio de las metástasis (Balch y cols, 2001).

#### 1.4 El Melanoma intraocular

Constituye la neoplasia intraocular más frecuente en adultos y es infrecuente en la raza negra. A diferencia del cutáneo, en el melanoma ocular no se reportan incrementos significativos en la incidencia y en la mortalidad en las últimas décadas. La mediana de supervivencia de estos pacientes en estadio metastásico según diversas series no sobrepasa los 9 meses (Singh y Topham, 2003; Young y Seddon, 2005). Puede localizarse en la coroides o úvea, el cuerpo ciliar y el iris. Se describe mayor riesgo de desarrollo de melanoma uveal en pacientes de ojos claros y en aquellos con el síndrome del nevo displásico y la melanocitosis ocular y cutáneo-ocular (Harbour y cols., 2004).

##### 1.3.1 Cuadro clínico.

El melanoma del iris puede presentarse como cambios del color hasta la presencia de masas que causan distorsión pupilar y glaucoma secundario. Los del cuerpo ciliar son de gran tamaño al momento del diagnóstico, debido a su crecimiento silente por estar alejados de la mácula. El melanoma coroides puede ser asintomático y detectarse en un chequeo oftalmológico de rutina. Aparece como una elevación melanótica o amelanótica en forma de hongo y rodeada de líquido subretinal de color naranja debido a la presencia de lipofuscina en los macrófagos del tumor. Los síntomas más frecuentes son la reducción de la agudeza visual, la visión distorsionada y la presencia de "centelleos". El crecimiento tumoral es variable, pero suelen tener crecimiento rápido (melanomas de células epitelioides). Las metástasis son hematógenas y no linfáticas, debido a la ausencia de linfáticos en el tracto uveal y la órbita. El sitio de metástasis más frecuente es el hígado (90% de los casos). Se observan con menor frecuencia metástasis pulmonares y cutáneas (Giblin y cols., 2004).

Los métodos diagnósticos utilizados son: el *examen del iris con transiluminación* y el *fondo de ojo con fotografías* para monitorear las lesiones sospechosas, la *angiografía fluorescente*, que permite detectar el melanoma uveal y la *ultrasonografía*, particularmente útil en el melanoma uveal posterior. La *biopsia por aspiración de aguja fina (BAAF)* junto a la *biopsia quirúrgica* se utilizan solo de forma previa al tratamiento quirúrgico inminente debido a las consecuencias que conllevan (Faulkner-Jones y cols., 2005).

### 1.3.2 Tratamiento del melanoma intraocular y pronóstico

La *cirugía* constituye el tratamiento fundamental y contempla desde la resección local en lesiones muy pequeñas y localizadas en el iris hasta la enucleación o la exenteración orbitaria en tumores voluminosos y extensos de la órbita. La *Braquiterapia con placas radioactivas episclerales* se utiliza como adyuvante de la cirugía. Con este método pueden tratarse tumores de pequeño tamaño y grosor menor de 8 mm aunque la modalidad neoadyuvante no produce ventajas clínicas (Damato y cols., 2004). Los isótopos más usados en el tratamiento son el yodo 125, el rutenio 106 y el iridio 192. La *termografía transpupilar* con un diodo láser y longitud de onda de 810 nm resulta útil en melanomas situados detrás del ecuador del ojo y con grosor menor de 4 mm. La *Fotocoagulación con láser* también puede utilizarse en el tratamiento de casos seleccionados. (Shields y cols., 2004; Shields., 2006). La Quimioterapia y la Inmunoterapia en adyuvancia a la cirugía no mejoran los resultados. (Damato y cols., 2004). En la enfermedad metastásica hepática, la *Quimio o inmunoterapia regional* es un método utilizado con limitado éxito, en forma de quimioembolización y perfusión hepática aislada con fármacos citotóxicos como Cisplatino, Vincristina, Nitrosoureas y Gemcitabine e inmunoterápicos como el Factor Estimulante de Colonias Hematopoyéticas Granulocíticas (*G-CSF* por sus siglas en inglés) (Feldman y cols., 2004). No hay reportes de interés sobre el uso de otras variantes de inmunoterapia en esta localización tumoral. El IFN y la IL-2 producen menos del 1% de

respuestas objetivas (Agarwala y cols., 2004). El melanoma intraocular es refractario a la mayoría de los tratamientos y suele ser excluido de los ensayos clínicos para melanoma metastásico (Shields y Shields, 2004). Este tumor se considera de peor pronóstico que la variante cutánea. La edad avanzada, la localización y el tamaño tumoral (tumores voluminosos del segmento posterior del ojo) y la variedad histológica de melanoma de células epitelioides son variables pronósticas desfavorables. Adicionalmente, otros factores como la presencia de redes y asas vasculares y la monosomía del cromosoma 3 (Kivela y cols., 2004; Sandinha y cols., 2005). En etapa metastásica sólo el 13% de los pacientes alcanza una SV global de un año después del diagnóstico de las metástasis (hepáticas fundamentalmente). En la actualidad, no existen para el melanoma ocular metastásico opciones terapéuticas válidas para una recomendación basada en evidencias (Buzaid y cols., 2011).

#### 1.4 Tratamiento del melanoma cutáneo.

##### 1.4.1 *Tratamiento del melanoma localizado (Etapas I-II)*

La **cirugía** es el único tratamiento curativo que además proporciona la verificación del diagnóstico y la microestadificación de la lesión. Actualmente se sugiere 1 cm de margen para lesiones de grosor inferior a 1 mm y 2 cm con o sin resección de la fascia muscular suprayacente para aquellas mayores de este límite, según el caso. Esto se basa en el hecho de que el riesgo de recurrencia local está directamente asociado a la profundidad de la lesión primaria. Algunos sitios anatómicos en los cuales la resección se hace imposible por razones estéticas o por la imposibilidad de lograr una exéresis completa son la excepción. Por ejemplo, los melanomas subungueales, que requieren la amputación de la falange distal o del dedo completo, o los melanomas de la región de la cara o palma de las manos, que requieren una biopsia por ponche en la porción más gruesa de la lesión (NCCN Guidelines versión 3. 2012 Melanoma ). La **Radioterapia**, por años relegada a un segundo plano debido a criterios

históricos de radiorresistencia de este tumor, se considera actualmente útil para aumentar el control local y la SV libre de enfermedad después de la exéresis de lesiones localmente extensas en vagina, cabeza y cuello y región axilar, sobre todo en la variedad desmoplásica, al disponerse de nuevas técnicas como la Braquiterapia y la irradiación con partículas, además de la Radioterapia de Intensidad Modulada y el hipofraccionamiento de las dosis ( Ballo y Ang , 2004; Chen y cols., 2008; Primoz y cols., 2010).

La opción de realizar la técnica del ganglio centinela en la búsqueda de metástasis subclínicas en los ganglios regionales (estadio IIIa) se debe ofrecer al paciente con tumores gruesos. Se trata de un proceder que permite la estadificación correcta del paciente en estadios iniciales, sobre todo en aquellos con alto riesgo de recaídas (Gershenwald y cols., 2000). Este método ha permitido evitar tratamientos excesivos y cohesionar el grupo de pacientes con ganglios negativos como grupo de buen pronóstico, lo que resulta importante para la comparabilidad y certeza de los resultados de ensayos clínicos (Morton y cols., 1992, 2005).

### ***Inmunoterapia adyuvante***

La terapéutica adyuvante sistémica en este grupo se recomienda en el caso de pacientes con suficiente riesgo de recaída como para enfrentar la toxicidad del mismo (pacientes con tumores en estadios IIb, IIc, y IIIa). Las opciones serían: participar en un EC, la observación clínica y el uso de Interferón Alfa recombinante 2b (IFN) (categoría 2b de consenso de la NCCN versión 3.2012 Melanoma ). Este último, administrado a bajas dosis no demostró ventajas en la SV libre de recaídas o en la SV global de los pacientes tratados (Kirkwood y cols., 2000). La FDA recomendó el tratamiento adyuvante del melanoma de alto riesgo con IFN altas dosis en 1996, de acuerdo a los resultados consecutivos de los estudios 1684, 1690 y 1694 del East Cooperative Oncology Group (ECOG) de EE.UU., (Kirkwood y cols., 1996; Kirkwood y cols., 2000; Kirkwood y cols., 2001, Verma y cols., 2006; Wheatley, 2007). Esta terapéutica incrementa

la supervivencia libre de enfermedad, pero no la supervivencia global, y su alta toxicidad hace difícil su aceptación tanto por los médicos como por los pacientes (Riestschel y Chapman 2006; Levesque 2008). Por esta razón, el papel del Interferón en el melanoma de intermedio y alto riesgo permanece aún sin definir (NCCN Guidelines. Melanoma versión 3. 2012).

#### 1.4.2 *Tratamiento de la enfermedad extendida a los ganglios regionales (Etapa III)*

En esta etapa la presencia de adenopatías regionales puede ser subclínica (Etapa IIIa) o con ganglios detectables al examen físico (Etapa IIIb). En el primer caso como se expresó antes, la *biopsia del ganglio centinela*, permite identificar las metástasis. Los resultados de Morton y cols., en el ensayo clínico Fase III MSLT-1 (observación versus técnica del ganglio centinela en pacientes con melanomas de grosor intermedio) no mostraron mejoría de la supervivencia global (Morton y cols., 2005). Actualmente, la *biopsia del ganglio centinela* se recomienda para melanomas de alto riesgo y su realización debe someterse a la decisión del paciente y su médico (categoría 2b de consenso en la NCCN versión 3.2012) (Thompson y cols., 2007; Andtbacka y cols., 2009). Tiene la ventaja del bajo riesgo de complicaciones y falsos positivos. Con este procedimiento se han identificado hasta un 20% de metástasis ocultas en pacientes con enfermedad clínicamente localizada (Thompson y cols., 2007). En el estadio IIIb, la *linfadenectomía radical* es el único tratamiento efectivo. No se recomienda realizarla de forma electiva sin evidencias de la afectación ganglionar. Conlleva previamente una biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) para confirmar el diagnóstico (NCCN Guidelines version.3 Melanoma). La etapa III se caracteriza por la alta frecuencia de recurrencias (60-70%) (Balch y cols., 2001), situación que demuestra la necesidad de un tratamiento complementario a la cirugía.

#### ***Tratamiento adyuvante en el estadio III.***



Las opciones de los pacientes después de la cirugía en esta etapa serían: la *Radioterapia* sobre el lecho tumoral en determinados casos, como se expuso antes y en pacientes con ganglios positivos en número mayor de 3, con más de 3 cm de diámetro y extensión extracapsular, ya que este tratamiento permite un mayor intervalo para la recaída de la enfermedad (Henderson y cols., 2009; Agarwala, 2009a). La *Quimioterapia y la Bioquimioterapia*, no se recomiendan para el tratamiento adyuvante por su alta toxicidad y pocos resultados terapéuticos a largo plazo (NCCN Guidelines versión 3.2012 Melanoma). La *inmunoterapia*, representa la alternativa más estudiada de acuerdo a las características de este tumor, altamente influenciado por el sistema inmune. El INF a altas dosis al igual que en el melanoma de alto riesgo, es la indicación, excepto en el estadio IIIc con metástasis en tránsito (Petrella y cols., 2012, NCCN Guidelines versión 3.2012 Melanoma). Produce intensos síntomas generales, elevación de las transaminasas hepáticas, náusea, vómitos, mielosupresión, disfunción tiroidea, depresión, entre otras; esto hace necesario reducir las dosis en más del 40% de los pacientes, por lo que esta indicación no debe hacerse de forma rutinaria. Es un planteamiento terapéutico a realizar con el consentimiento informado del paciente (Kilbridge y cols., 2001; Levesque y cols., 2008). El *Interferón pegilado o de liberación controlada*, (PEG-Intron®) produce menos toxicidad que el tratamiento clásico con IFN a altas dosis y tiene la ventaja de su administración semanal. Sus resultados en cuanto a SV libre de recaídas, (no así en la SV global) motivaron el reconocimiento de la FDA en el año 2011 como una opción terapéutica en el melanoma con extensión ganglionar completamente resecada. (Haushild A y cols., 2006; Eggermont y cols., 2008; Herndon y cols., 2012). La *Inmunoterapia Activa Específica* con vacunas, produce toxicidad mínima y resultados alentadores en pacientes con enfermedad localizada de alto riesgo. Sin embargo, estos resultados no demuestran la realidad porque en su mayoría se obtuvieron en pequeños ensayos clínicos Fase I-II con criterios relativos a supervivencia global o el intervalo para la progresión que no se reprodujeron en los estudios Fase III (Eggermont y

Gore, 2007; Terando y cols., 2007; Finke y cols., 2007; Rosenthal 2008). Con el panorama anterior no puede inferirse una recomendación terapéutica definitiva para el melanoma en estadio de enfermedad regional o de alto riesgo. Los estudios aleatorizados multiinstitucionales en este escenario, que incluyen entre otros a los nuevos fármacos aprobados recientemente por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico, deben definir la conducta en el futuro mediato.

### ***Tratamiento de las metástasis en tránsito estadio IIIc***

Las metástasis cutáneas localizadas entre el sitio primario y la estación linfática regional, se denominan metástasis en tránsito. (N2c del pTNM). Les siguen generalmente las metástasis sistémicas en un periodo de 6 a 12 meses (de Vita y cols., 2008). Estas metástasis son más frecuentes en los miembros inferiores, en curso hacia los ganglios de la región inguinal y se presentan en cerca del 20% de los melanomas del miembro inferior. No existe un tratamiento estándar. Las opciones son: *la Cirugía* (exéresis local), que debe considerarse en caso de lesiones limitadas en número y tamaño y la amputación de un miembro como alternativa que es viable solo por razones sanitarias. *La inmunoterapia con BCG intralesional* es una posibilidad para el control local en casos inoperables que produce respuestas en el 60% de los pacientes. El Imiquimod, inmunomodulador disponible en solución y en crema al 5% (Imidazolquinolina), originalmente aprobado por la FDA para el tratamiento de las verrugas producidas por Herpes virus (HPV), resulta útil en el tratamiento de lesiones cutáneas múltiples, administrado localmente o de forma intralesional, sobre todo combinado con IL-2 o IFN. Adicionalmente, la Difencliprona, con propiedades inmunomoduladoras, también ha dado resultados combinada con el DTIC por la IV y la Radioterapia (Good y cols., 2011). *La Quimioterapia y la Bioquimioterapia sistémica* no se recomiendan; resultan muy tóxicas e inefectivas dado el carácter localizado y poco sintomático de las lesiones (NCCN Guidelines Melanoma versión 3,

2012). *La Quimioterapia regional con perfusión o infusión arterial e hipertermia*, se realiza con éxito en algunas instituciones utilizando como fármacos el Alkerán, DTIC o Cisplatino. Su administración conlleva técnica y equipamiento costosos y debe ser realizado por personal entrenado con gran experiencia en el método (Boesch y cols., 2010). No existen datos definitivos del uso de la *radioterapia* en estas lesiones, solo aparecen reportes aislados de instituciones que la utilizan en tratamientos de intención paliativa (Ballo y cols, 2004).

#### 1.4.3 Tratamiento de la enfermedad metastásica

En la etapa IV la enfermedad es incurable. Menos del 15% de los pacientes en esta etapa alcanzan a vivir 3 años. El cuadro clínico puede variar ampliamente, desde una evolución rápida de las metástasis hasta una aparente estabilización por algunos períodos; por esta razón el juicio clínico es importante para decidir el mejor tratamiento paliativo. Se debe tener en mente la premisa de *no hacer daño*. Los pacientes deben ser evaluados para evaluar el grado de diseminación de la enfermedad y posteriormente la posibilidad de incluirlos en ensayos clínicos, marco donde se ofrecen las mayores oportunidades terapéuticas, se refina la utilidad y pertinencia de los diferentes tratamientos o se puede tener acceso a nuevos fármacos o tecnologías en evaluación y/o desarrollo (NCCN Guidelines versión 3. 2012 Melanoma).

*La cirugía*, está indicada siempre que existan metástasis en número limitado y resecables sin daño a la calidad de vida del enfermo. Esto es aplicable para metástasis cutáneas y subcutáneas, suprarrenales, cerebrales, pulmonares y aún en el tracto gastrointestinal. Varios autores sugieren que estas metastasectomías influyen positivamente en la inducción de una respuesta inmune endógena favorecedora de la SV en los pacientes (Collinson y cols., 2008; Lee y cols., 2009; Olilla y cols., 2011, Wasif y cols., 2011), por lo que se recomienda la realización de metastasectomías pulmonares, suprarenalectomías, exéresis de nódulos SC, etc., en los pacientes oligometastásicos (NCCN Guidelines versión 3. 2012 Melanoma). *La*

*Radioterapia* tiene valor en el control de síntomas, principalmente dolor, hemorragias, destrucción ósea, compresión medular y obstrucción de estructuras mediastinales. Además, juega un papel crucial en el tratamiento de las metástasis cerebrales en modalidad combinada con la Quimioterapia (Samlowsky 2007; Chen y cols., 2008; Strojan y cols., 2010). Con respecto a la terapéutica sistémica, *la Quimioterapia y la Bioquimioterapia* son variantes de tratamiento válidas para los pacientes en etapa IV susceptibles de resección quirúrgica. En caso de enfermedad diseminada, la presencia de metástasis en el SNC determina las variantes de tratamiento, que van desde la resección quirúrgica de las lesiones y la Quimio-radioterapia para los pacientes asintomáticos, hasta la Quimioterapia o el tratamiento de soporte para los sintomáticos (NCCN Guidelines, Melanoma, versión 3, 2012).

#### **Terapéutica sistémica de la enfermedad diseminada.**

En el grafico 1 se resumen las principales opciones terapéuticas de acuerdo al grado de recomendación de la NCCN. *La Quimioterapia* con DTIC produce respuestas objetivas entre el 18 al 20% de los pacientes tratados y menos del 5% de respuestas completas. La Temozolamida no ha mostrado mejorías en la SV, ni incluso en el intervalo libre de progresión (Serrone y cols., 2000; Middleton y cols., 2000); es útil en el tratamiento de las metástasis cerebrales por su característica farmacológica de atravesar la barrera hematoencefálica, no requerir activación metabólica y la facilidad de administración por vía oral. *La IL-2* produce un 15% de respuestas objetivas con toxicidad que puede llegar a ser grave y asociada a una mortalidad del 1 al 2%. Las respuestas completas obtenidas son de larga duración en el 5-6% de los pacientes tratados. Esto motivó su aprobación por la FDA en 1998 (Atkins, 2000, 2002, Curti y Urba, 2012). El perfil de toxicidad comprende: síndrome de pérdida del lecho capilar, hipotensión grave, insuficiencia renal, síntomas neuropsiquiátricos, etc. Este tratamiento solo puede ofrecerse a pacientes con buen estado general y funcionamiento orgánico normal. Se ha

intentado su uso en asociación con el IFN, pero algunos estudios demuestran que la combinación no produce resultados relevantes en esta etapa clínica. (Sparano y cols., 1993). La *Poliqumioterapia* se recomienda en pacientes con enfermedad rápidamente progresiva y sintomática. Proporciona entre el 30 al 45% de respuestas objetivas, también con alta toxicidad y sin aumentos en la SV global( . La *Bioqumioterapia* se ha usado basada en las premisas de los estudios pre clínicos que sugieren sinergia entre las combinaciones de IL-2 o IFN y fármacos citotóxicos. Se sustenta en algunos argumentos: la sensibilidad a la inmunoterapia es superior cuando ocurre cito- reducción con fármacos citotóxicos. Esta concurrencia induce la estabilización de blancos antigénicos en la membrana celular, estimula la respuesta inmune mediada por la IL-2 y puede causar la alteración de los perfiles farmacocinéticos de algunos fármacos como la Temozolamida a través del incremento de la permeabilidad capilar y de modificaciones metabólicas. Por otra parte, puede aumentar la actividad citotóxica del cisplatino al activar la cascada secundaria de citoquinas (Mitchell, 1992; Sasse y cols., 2007). La *Bioqumioterapia* produce tasas de respuestas entre 40 al 65%, sin beneficios en cuanto a SV global y con toxicidad grado III-IV que complica la terapéutica. De acuerdo a los resultados de metanálisis sobre el tema, se recomienda como categoría 2b en pacientes seleccionados (Yves y cols., 2007). No se recomienda la *Bioterapia con Interferón* (15% de respuestas objetivas con una duración media de 6 a 9 meses

### ***Inmunoterapia basada en blancos terapéuticos***

La inhibición de los procesos involucrados en el desarrollo del tumor son blancos terapéuticos para la inmunoterapia que han mostrado resultados alentadores ( Smalley y Herlyn., 2005). La *Antiangiogénesis*, se ha ensayado con productos que van desde fármacos conocidos como la Talidomida (Reiriz y cols., 2004), pasando por anticuerpos monoclonales inhibidores del VEGF, así como los pequeños inhibidores de tirosin-kinasa Sunitinib y Sorafenib, que han mostrado

actividad en ensayos clínicos fase I (Okeke y cols., 2005; Minor y cols., 2012). Otros fármacos con acción antiangiogénica son los Inhibidores del sistema enzimático de la matriz metalloproteinasa como el Sorafenib, registrado para el tratamiento del carcinoma de células renales, pero que en melanoma, usado en combinación con quimioterapia, específicamente Carboplatino y Paclitaxel no produjo los resultados esperados (Haushild y cols., 2009). Con acción antiangiogénica también están los *AcMs dirigidos contra integrinas*, moléculas relacionadas con la proliferación celular y altamente expresadas en el melanoma, específicamente en la fase de crecimiento vertical y en las lesiones metastásicas. Etaracizumab es un AcM IgG1 dirigido a las  $\alpha v \beta 3$  integrina cuyo desarrollo se detuvo en los estudios Fase III a pesar de presentar resultados positivos en EC iniciales. (Mitjans y cols., 2000). Ipilimumab, (Yervoy® de Bristol- Myers Squibb) es un AcM que activa el sistema inmune inhibiendo la molécula CTL4A (antígeno 4A de linfocitos citotóxicos) que suprime la respuesta inmune contra el tumor. Fue el primer fármaco que demostró beneficios para la supervivencia global en el melanoma avanzado. Se aprobó en marzo del 2011 por la FDA como tratamiento de primera y segunda línea en esta enfermedad y como segunda línea por la EMEA (*European Medicine Agency, por sus siglas en inglés*). Los EC Fase II y III de este fármaco sólo o combinado con vacunas, IL-2 o DTIC mostraron duplicación de la supervivencia global en pacientes en estadios III y IV, lo que constituye un hecho relevante en esta enfermedad. Sin embargo, los eventos adversos asociados con el tratamiento relacionados con su acción sobre las células T son difíciles de enfrentar; incluyen diarrea, deficiencias endocrinas, rash cutáneo en 60% de los pacientes (15% grados III y IV) además de reacciones de autoinmunidad en el 12.9%, severas y en algunos casos fatales ( Hodi y cols., 2010). Todo esto limita la utilización del medicamento y determinó la creación de una “Estrategia de Evaluación del Riesgo y Mitigación de la Toxicidad” (*REMS, por sus siglas en inglés,*) que debe ser aplicado a los pacientes sometidos a esta terapéutica. Otra variante significativa de tratamiento para el melanoma avanzado la

constituyen los *Inhibidores de BRAF*; proteína quinasa del oncogen del mismo nombre regulada por RAS que interviene en la transformación maligna y el crecimiento celular. Vemurafenib, (Zelboraf® de Genentech), se aprobó por la FDA en el mes de agosto del 2011 para el melanoma metastásico o irresecable en base a los resultados del ensayo BRIM-3 presentados en ASCO Meeting 2011. Este estudio comparó este fármaco con el DTIC en 675 pacientes y produjo resultados relevantes en materia de respuestas objetivas y SV libre de progresión. Vemurafenib puede considerarse un ejemplo de medicina personalizada en el tratamiento de esta enfermedad, ya que requiere para su aplicación que el test Cobas 4800 BRAF V600 sea positivo e identifique la mutación de BRAF en el paciente. No obstante las ventajas señaladas con este fármaco, las respuestas que produce duran solo un promedio de seis a siete meses, ya que los fenómenos de resistencia intrínseca y extrínseca aparecen indefectiblemente. Se debe señalar que como efecto adverso característico, produjo Carcinoma de Células Escamosas cutáneo en el 26% de los pacientes tratados. c-KIT se encuentra expresado en una minoría de melanomas, principalmente en los melanomas acrales y de las mucosas. Los fármacos Imatinib, Sunitinib y Dasatinib, diseñados para este blanco terapéutico son útiles en el tratamiento de pacientes con tumor que exprese esta mutación (Guo y col., 2011). Otra diana molecular actualmente en estudio con resultados prometedores para la terapéutica futura del melanoma metastásico es el *Programed Death-1*, o Receptor de muerte programada en los linfocitos T activados (*PD-1 por sus siglas en inglés*). Un AcM humanizado contra este co-receptor mostró resultados positivos en un ensayo clínico fase I presentado en las sesiones del Congreso del año 2012 de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (*ASCO Meeting 2012, por sus siglas en inglés*). La terapéutica dirigida a otros blancos moleculares en esta enfermedad, entre ellos aquellos dependientes de RAS, RAF y MEK entre otros, se explora actualmente, con resultados prometedores en los ensayos clínicos. (Smalley y Herlyn, 2009; Russo y cols., 2009; Soon y cols., 2010; Robert y cols., 2012)

## Inmunoterapia activa específica

El conocimiento de que la manipulación del sistema inmune asociada a la presencia de antígenos tumorales es capaz de destruir tumores, ha permitido dirigir el ataque a éstos a través de la inducción de respuestas de anticuerpos citotóxicos y células T efectoras. Las células presentadoras de antígenos son capaces de reconocer las células transformadas y desencadenar la activación de los elementos de la respuesta inmune. (Wiemann y Starnes, 1994, Rosenberg, 1999). La validación del concepto de vacunas en cáncer se sustenta en este conocimiento. La *inmunoterapia activa específica con vacunas* ha sido explorada intensamente en el melanoma metastásico en los últimos 20 años (Schlom y cols., 2007). Puede decirse que su desarrollo ha ido paralelo al incremento de los conocimientos acerca de la función de las células T, el uso de los adyuvantes, la generación de subtipos de linfocitos influenciada por el efecto de las diferentes citoquinas, y los mecanismos de reconocimiento de los antígenos a través del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (MHC), lo que ha permitido reconocer un gran número de antígenos presentes en las células de melanoma como nuevos blancos terapéuticos y por ende, desarrollar preparados vacunales basados en ellos (Hersey y cols., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos no son repetibles en los estudios Fase III. En el cuadro 1 se resumen las principales estrategias de vacunación en melanoma. Cancervax de Morton y cols., una vacuna de células completas alogénicas de melanoma, irradiadas y unida al BCG despertó muchas expectativas en un ensayo clínico Fase II. Si bien los resultados en cuanto a SV global resultaron significativos, (23.1 meses comparados con los del control de 7.3 meses) este estudio fue objeto de críticas por el uso de un control histórico en lugar de uno concurrente (Morton y cols., 1992). Canvaxin no mostró diferencias con respecto al control en la Fase III. Melacine de Mitchell y cols., utilizó derivados de pared bacteriana con lisados de células alogénicas de melanoma adyuvada con DETOX, (lípidos A no tóxicos de la Salmonella Minnesota). Se comparó con el régimen de Quimioterapia Darmouth (Cisplatino, DTIC,



Vinblastina) sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mediana de SV pero con mejor calidad de vida para los pacientes que recibieron la vacuna. Se pudo demostrar respuesta clínica específica en pacientes con 3 diferentes tipos de alelos para HLA Clase I (Mitchell 1997, 1998). Las vacunas de células dendríticas, cargadas con péptidos o Ags tumor específicos en melanoma producen respuesta celular apreciable y variables respuestas clínicas (Stein, 2011; Dillmann y cols., 2011). Sólo en cáncer prostático hormono resistente, una vacuna de este tipo (Dendreon, Sipuleucel) logró registro al aumentar el plazo de la SV global en estos pacientes (Petrylac, 2006) Las vacunas contra antígenos específicos, (vacunas moleculares) contienen antígenos tumor- específicos total o parcialmente purificados. Las más representativas, son las de *gangliósidos*, las de *proteínas purificadas o de péptidos*, las de *anticuerpos antiidiotípicos*, y las *vacunas de antígenos polivalentes* (Cuadro 1). Las *proteínas de choque térmico* (del inglés: *heat shock protein*) son moléculas que intervienen en procesos proliferativos celulares y se han identificado como blancos para la terapia biológica, por participar activamente en los procesos de tumorigénesis (Srivastava y cols., 1994; Belli y cols., 2002), pero no han demostrado ventajas en los estudios aleatorizados. (Testori y cols., 2008). La vacuna con el péptido gp100 asociado a IL-2 se estudió en un ensayo fase III y mostró buenos resultados en cuanto a respuestas y SV libre de progresión pero toxicidad elevada relacionada con el tratamiento con IL-2. (Schwartzentruber y cols., 2011).

## 1.5 Gangliósidos como blancos para la inmunoterapia del melanoma

### 1.5.1 Características de los gangliósidos, presencia en los tejidos normales y tumorales y principales funciones.

Los gangliósidos son moléculas que contienen ácido neuramínico y son componentes de la monocapa externa de la membrana plasmática. Están orientados hacia el exterior de la célula por su porción de carbohidrato, donde actúan como antígenos (Ags) de la superficie celular

(Lloyd, 1993) y pueden ser reconocidos por Acs u otras moléculas en dependencia de su densidad en la superficie (Nores y cols., 1987). Se encuentran en las células de los mamíferos (Fischman y Brady, 1976) y prácticamente, en todos los vertebrados (Wiegandt, 1985). Por sus características estructurales pertenecen a la gran familia de los glicosfingolípidos, y es distintivo en ellos la presencia de uno o más residuos de ácido siálico en sus dominios oligosacáridicos. La mayor parte de las funciones atribuidas a los gangliósidos están vinculadas a las interacciones que median entre esta región y otras moléculas (Stults y cols., 1990). La expresión de los gangliósidos en la superficie celular varía de acuerdo al tipo de célula, órgano y especie (Seyfried y cols., 1982) y está sujeta a cambios durante el desarrollo ontogénico (Yu y cols., 1988), con la edad de los individuos (Svenerholm y cols., 1989) y en diferentes etapas del ciclo celular. La diversidad de residuos sacarídicos crea una variedad de epitopos que pueden ser reconocidos por diversos Acs y moléculas. Han sido implicados en la interacción con ligandos solubles u organismos enteros, independientemente de su pequeño tamaño. Pueden constituir receptores de IFN (Wiegandt, 1985), actuar como mediadores de las interacciones célula-célula. (Thomas y Brewer, 1990). Tienen un importante papel en la regulación de los eventos relacionados con la proliferación celular a través de la modulación de proteínas de la membrana donde funcionan como receptores, transductores y transportadores (Hakomori, 1990). Los gangliósidos se conocen también como supresores de la respuesta inmune (Shurin y cols., 2001) y se encuentran relacionados con la diferenciación celular. Los más comúnmente encontrados son el N-acetil GM3, presente en tejidos normales humanos y animales y el NGlicolil GM3, prácticamente ausente en tejidos normales humanos y de pollos, pero presente en varios tumores de origen neuroectodérmico como los pediátricos Neuroblastoma y T. de Wilms lo que orienta hacia su posible papel en la diferenciación de los tejidos y el proceso oncogénico. (Scursoni y cols., 2010, 2011). Están presentes también en Melanoma y cáncer mamario (Carr y cols., 2000) de colon, recto, estomago, hígado y páncreas (Blanco y cols., 2011

a y b). En el caso de NeuGc es evidente su baja expresión en tejidos normales de alta replicación pero están presentes en los tumores, incorporados a través de la dieta. (Tangvoranuntakul y cols., 2003). Estas moléculas juegan un importante papel en la progresión tumoral y en la metastatización, ya que afectan múltiples eventos en la respuesta inmune al actuar como factores solubles en la inmunosupresión inducida por los tumores. (Ladish y cols., 1987, Birkle y cols., 2000; De León y cols., 2006; Labrada y cols., 2010). Los gangliósidos más expresados en melanomas son el GM3 y el GD3 (GD3>GM3); juntos alcanzan el 80 % del total de gangliósidos. (Portoukalian y cols., 1979). El patrón que presentan en el melanoma humano es de considerable interés. Los melanocitos normales contienen, predominantemente, el gangliósido GM3, en tanto que la expresión de GD3 se incrementa después de la transformación neoplásica. Por esa razón, cuando el melanoma progresa a variantes altamente metastásicas hay una variación pronunciada en la relación GM3:GD3 (Ravindranath y Morton, 1991). La proporción GM3:GD3 se invierte durante la desdiferenciación de melanocitos (15:1) a células de melanoma (1:16) (Ravindranath y cols., 1989).

### *1.5.2 Inmunogenicidad de los gangliósidos*

Los gangliósidos son reconocidos como antígenos tumor asociados y se consideran blancos para la inmunoterapia activa específica. Esta afirmación, sin embargo, ha sido por largo tiempo objeto de debate debido a su naturaleza timo- independiente, que los hace poco inmunogénicos (Zhang y cols., 1997). Esto se debe entre otras razones a su composición química: su estructura compuesta de grupos químicos sencillos de naturaleza oligosacarídica no encierra secuencias que puedan constituir epitopos T para la cooperación celular entre linfocitos T y B en la respuesta inmune (Livingston, 1991). La inmunización con gangliósidos, generalmente, conduce a respuestas de Acs de isotipo IgM y de baja afinidad. Estas respuestas son casi siempre de corta duración, y los títulos séricos no se incrementan con las administraciones

posteriores del inmunógeno, lo cual indica la presencia de una respuesta primaria carente de linfocitos B de memoria y de maduración en cuanto a la afinidad para las inmunoglobulinas producidas. Todas estas características corresponden a una respuesta clásica a Ags. Timo-independientes (Livingston, 1995). Es por ello que en la inmunoterapia activa contra los tumores utilizando los gangliósidos como blancos, se debe incrementar la inmunogenicidad de estos Ags y al mismo tiempo, involucrar a las células T, de manera tal que se logre una respuesta secundaria de Acs, específicamente Acs IgG de alta afinidad ( Livingston ,1995; Estévez y cols., 2000). Los gangliósidos que contienen la forma Nglicolilada del ácido siálico, son antígenos heterófilos (ausentes en tejidos normales y presente en los tumorales) (Kawai y cols., 1991). Tienen esta condición debido a la delección en la zona carboxi terminal del gen que codifica para la enzima CMP hidroxilasa (Malykh y cols., 2001). Esto les confiere mayor inmunogenicidad a diferencia de la forma N- acetilada.

### *1.5.3 Relación del ácido N- glicolil neuramínico y el melanoma.*

Existen evidencias que relacionan al ácido N Glicolilneuramínico como antígeno tumor específico en el melanoma.

- Títulos significativamente elevados de anticuerpos IgG e IgM preinmunes contra una glicoproteína bovina que contiene el antígeno Hanganutziu Deicher (HD), que es el ácido siálico N-Glicolilado (Koda y col., 1994), evidenciaron un mejor curso clínico en pacientes con melanoma en estadio II (Nakarai y cols., 1990).
- Pacientes tratados con un oncolisado de 4 líneas de melanoma y vaccinia virus, que desarrollaron anticuerpos anti- NeuGcGM3 de isotipo IgG, presentaron evidencias de aumento de SV libre de progresión (Doré y cols., 1990).
- El antígeno heterófilo Hanganutziu-Deicher (HD) correspondiente al glicoconjugado del ácido N Glicolilneuramínico está presente en numerosos tumores y líneas celulares

tumorales humanas, no así en los tejidos normales (Koda y cols., 1994, Malykh y cols., 2001).

- El AcM murino 14F7, un IgG1 murino anti-Nglicolil GM3 demostró intenso reconocimiento en células de melanoma primario (Carr y cols., 2000).

Lo último justifica la posible utilización del NeuGcGM3 como antígeno dentro de una formulación vacunal para el tratamiento del melanoma. La inmunogenicidad de esta molécula es superior al NeuAcGM3 al tener la forma Nglicolilada.

## 1.6 NeuGcGM3 como blanco para la Inmunoterapia específica: formulación NeuGcGM3/VSSP

### 1.6.1 *Neisseria meningitidis* y sus componentes: capacidad adyuvante

La *Neisseria meningitidis* es una de las dos especies patógenas del género *Neisseria*. Esta bacteria es un diplococo Gram-negativo, (meningococo) que presenta dos membranas celulares separadas por una lámina de péptido glicano. En la membrana externa el 50 % está constituido por moléculas anfífilas de lipopolisacárido (LPS), endotoxina principal de la bacteria. Otros componentes importantes son las diversas proteínas transmembranarias. Los meningococos, de forma espontánea liberan vesículas naturales de membrana externa (VNME) que se han utilizado como adyuvantes, transportadoras de Ags y también en la generación de vacunas anti-meningitis. Las vacunas anti-meningococo que están en uso consisten precisamente en vesículas de membrana externa a las que se les eliminó parte de LPS. Estas formulaciones en humanos, demostraron su inmunogenicidad y su capacidad de generar altos títulos de Acs bactericidas (Sierra y cols., 1991 y Bjune y cols., 1991). Para utilizar las VNME como transportadores y adyuvantes se desarrollaron también nuevas tecnologías como los proteosomas generados por Lowell y colaboradores, en los cuales las proteínas de membrana forman unas estructuras multimoleculares en forma de vesículas membranosas de 60-100 nm de diámetro (Lowell y cols., 1988). La conjugación hidrofóbica de péptidos poco inmunogénicos

a los proteosomas, indujo altos títulos de IgG en ratones sin el uso de adyuvantes adicionales. Estos proteosomas también se utilizaron para inducir respuesta específica al gangliósido GD3, altamente expresado en algunas células tumorales. El gangliósido GD3 incorporado a los proteoliposomas de *Neisseria meningitidis* indujo Acs de isotipo IgM capaces de inducir CDC, pero no se detectaron por ELISA Acs de isotipo IgG (Livingston y cols., 1997). Esta tecnología se aplicó a los gangliósidos para aumentar su inmunogenicidad con el objetivo de lograr respuestas apreciables de anticuerpos en la inmunoterapia con estas moléculas.

#### 1.6.2 Inmunoterapia activa específica con la formulación NeuGcGM3/VSSP

La incorporación del NeuGcGM3 en proteoliposomas de muy pequeño tamaño, (tecnología VSSP) colocó a los gangliósidos en el marco de los ligandos de la potente inmunidad innata a los gérmenes gram negativos, con el aumento consecuente de su inmunogenicidad y la conservación de su estructura antigenica intacta. La dramática reducción del tamaño de estas partículas (nanopartículas), permite que las soluciones con VSSP sean transparentes y puedan esterilizarse con filtros de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , contrariamente a otras preparaciones vacunales como las utilizadas por Livingston y la vacuna antimeningocócica del tipo B (Sierra y Campa, 1991; Livingston, 1997). Los estudios de la inmunogenicidad de NeuGcGM3/VSSP demostraron en ratones y pollos altos niveles de anticuerpos antigangliósidos de tipo IgM e IgG, en la respuesta medida por inmunotinción cromatografica de placa fina. (Estévez y cols., 2000). Datos pre clínicos muestran la actividad antitumoral de la formulación vacunal por las vías IM y SC en ratones (Labrada y cols., 2008). La restauración de los mecanismos de la respuesta inmune con la vacunación propicia el cambio de patrón de respuesta Th-2 a Th-1 (Estévez y cols., 2000). Además se demostró la presencia de respuesta de Igs con subclases del patrón Th1 en ratones (IgG2a+IgG2b > IgG1) y con esto, la maduración de las células dendríticas, la activación de las células NK y la generación de linfocitos CD8+, todas ellas, células que se

conoce ofician la respuesta antitumoral (Labrada y cols., 2010 a, b, c). Esta vacuna resultó segura cuando se administró a ratas a dosis repetidas por las vías IM y SC (Informes CENPALAB Códigos NGDR0802 y NGDR0203). También demostró ser segura e inmunogénica administrada a pacientes con carcinoma de mama avanzado o metastásico y generó Acs de isotipo IgM, IgG e IgA, con patrón Th1. Adicionalmente, los sueros post inmunes en estas pacientes demostraron capacidad citotóxica mediada por el complemento y reconocimiento en el tejido tumoral mamario (Carr y cols., 2003). Los Acs anti-NeuGcGM3 juegan un papel importante en la disminución del estado de inmunosupresión causado por los gangliósidos (Peguet-Navarro y cols., 2003; Crespo y cols., 2006; de León y cols., 2006 y 2008). Mulens y cols. demostraron su capacidad de secuestro de gangliósidos, lo que permite la reducción de la acción inmunosupresora de estas moléculas. (Mulens y cols., 2010)

NeuGcGM3 como blanco terapéutico cumple esencialmente los principales criterios del NCI para la priorización de moléculas en la inmunoterapia del cáncer: *Presencia apropiada en los tumores y no en los tejidos normales, Oncogenicidad, Inmunogenicidad y por último su función terapéutica* (Cheever y cols., 2009; Fernández y cols., 2010). La utilización de la vacunas NeuGcGM3/VSSP puede ser una oportunidad más para los pacientes con tumores que expresen esta molécula.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS



## CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El universo de estudio para este trabajo de tesis estuvo constituido por pacientes con criterio diagnóstico de Melanoma Cutáneo y/o Ocular Avanzado e irreseccable, en estadios IV o con enfermedad metastásica evolutiva, provenientes del Servicio de Tumores Periféricos del INOR y el Hospital Universitario Docente (HUD) Celestino Hernández Robau, de Villa Clara. Recibieron el tratamiento en el Servicio de Quimioterapia Experimental del INOR y el Servicio de Oncología del HUD Celestino Hernández en el período de tiempo transcurrido entre Octubre del año 2000 y febrero del 2009.

### *2.1 Estrategia*

Para alcanzar los objetivos propuestos, se diseñaron 2 ensayos clínicos Fase I-II dirigidos a evaluar 2 vías de administración diferentes: la vía intramuscular y la subcutánea. Ambos estudios se aprobaron de forma independiente por el Centro Estatal de Control de los Medicamentos (CECMED) (Anexos 1a y 1b) y contemplaron un escalado de dosis del preparado vacunal. Su descripción se realizará en el acápite destinado a cada ensayo clínico de acuerdo a su vía de administración. La expresión del gangliósido NeuGcGM3 en los tumores primarios y en las metástasis locoregionales se estudió en las biopsias disponibles y útiles para los estudios de inmunotinción de los pacientes con melanoma incluidos en estos ensayos clínicos.

### *2.2 Selección de pacientes*

En ambos estudios los pacientes se asignaron de forma abierta y secuencial a los niveles de dosis propuestos y se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

#### *2.2.1. Criterios de Inclusión y exclusión*

##### *Criterios de inclusión*

- Confirmación histológica de melanoma maligno

- Edad entre 18 y 70 años
- Estado general  $\leq 2$  de acuerdo a los criterios de la OMS. (Anexo 2)
- Expectativa de vida  $\geq 6$  meses.
- Con parámetros de laboratorio clínico normales:

Hematológicos:

HB  $> 10,5$ g /Leucocitos totales  $\geq 4 \times 10^9$

Neutrófilos:  $\geq 2 \times 10^9$

Plaquetas  $\geq 150 \times 10^3$

Hepáticos:

TGP- TGO, Fosfatasa alcalina y Bilirrubinas  $\leq 3$  veces el valor máximo válido para la institución.

Renales:

Creatinina:  $<135 \mu\text{mol/L}$

- Con terapéutica previa finalizada 4 semanas antes
- Consentimiento informado firmado.
- Prueba de embarazo negativa en mujeres en edad fértil, y uso de métodos anticonceptivos.

*Criterios de Exclusión:*

- Pacientes con más de 7 meses transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica
- Con metástasis cerebrales
- Enfermedades crónicas descompensadas

- Con infecciones agudas o crónicas, o serología positiva para Hepatitis B, C o VIH.
- Enfermedades psiquiátricas
- Antecedentes de alergias severas
- Enfermedades autoinmunes descompensadas
- Embarazadas o lactando

### 2.3. Consideraciones éticas

Los estudios se realizaron bajo los principios éticos regidos por la Declaración de Helsinki ratificada y enmendada en la 52ª Asamblea General de Edimburgo, Escocia, de octubre del 2000, posteriormente con enmiendas hasta 2009 (Anexo 3). Los protocolos de investigación se sometieron para su aprobación al arbitraje de los Comités de Ética del INOR (Anexo 4C, IM, 4E, SC) y el HUD Celestino Hernández (Anexo 4D).

#### 2.3.1 Información a los sujetos y obtención del consentimiento informado.

Toda la información relativa a la investigación se suministró en presencia de un familiar o allegado. Los pacientes tuvieron la oportunidad de preguntar sobre los pormenores del ensayo, así como el tratamiento que se ofrecería en caso de aparecer efectos adversos. El documento del Consentimiento Informado se confeccionó de acuerdo a lo reglamentado en el Manual de Buenas Prácticas Clínicas según la International Conference of Harmonisation (*ICH, por sus siglas en inglés*) e incluyó entre otros, los objetivos del estudio, los beneficios esperados, tratamientos de referencia, riesgos e inconvenientes y se entregó con el tiempo suficiente para ser analizado, con una copia para conservar (Anexos 5 a, IM y 5 b, SC). Se les explicó la no obligación a participar en el estudio, además, si había negativa a participar o el deseo de abandono en cualquier momento, no tendrían que dar explicaciones y esta situación no afectaría sus cuidados médicos posteriores.

## 2.4 Expresión del gangliósido NeuGcGM3 en las biopsias

La expresión del gangliósido NeuGcGM3 en las metástasis se evaluó en las biopsias disponibles de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. El estudio del reconocimiento se hizo por técnicas de inmunohistoquímica con el AcM 14F7 específico contra el gangliósido NeuGcGM3, evaluándose el tumor primario y las metástasis en los casos en que se disponía de los bloques de parafina con las muestras del tumor.

### 2.4.1 Procedimiento Inmunohistoquímico.

Se obtuvieron secciones de tejido fijado en formalina al 8% e incluido en parafina de 5 µm, cortados por medio de un micrótopo Leitz 1512, Alemania. Las muestras se mantuvieron a 70°C por 1 h, se desparafinizaron y rehidrataron en series descendentes de porcentaje de etanol, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena en 0,03% de peróxido de hidrogeno en metanol absoluto por 30 minutos (min). Todos los cortes se mantuvieron en agua destilada por 10 min para su rehidratación y después pasarlas por solución de TBS por 5 min más. Después de esto, se bloqueó la reactividad de todas las proteínas tisulares con una solución comercial (DakoX0909, Carpintería, EE.UU.) 10 min a temperatura ambiente (TA) para reducir la tinción inespecífica. Las láminas se incubaron con el anticuerpo monoclonal 14F7 (10 µg/mL) por espacio de 1 h en cámara húmeda, y después con homogeneizador biotinilado universal y estreptavidina-Fosfatasa Alcalina (Dako K0678, Carpintería, EE.UU.); 30 min cada paso. Se substituyó el 14F7 por tampón tris salino (TBS del inglés tris buffer saline) y se usó una muestra de carcinoma ductal infiltrante de mama como controles positivo y negativo respectivamente entre las incubaciones. Las muestras se lavaron con TBS por 10 min. La actividad enzimática se detectó con una solución comercial de fucsina (un cromógeno rojo) (Dako K0678, Carpintería, EE.UU.) para evitar confusión con la melanina. Después, se realizó la tinción de contraste con

hematoxilina de Mayer (Dako S2020, Carpintería, EE.UU.) y se montaron en medio acuoso (Dako S3025, Carpintería, EE.UU.) para su observación en el microscopio óptico.

#### 2.4.2 Evaluación de los resultados de inmunoreconocimiento por el gangliósido NeuGcGM3.

La intensidad de la reacción se estimó cualitativamente y se expresó como sigue: Negativa (-), Débil (+), Moderada (++), e Intensa (+++). Se usaron combinaciones de estos patrones para expresar niveles intermedios de expresión. El % de células reactivas (células positivas) se estimó en las áreas más representativas del tumor con un lente 10X y se les dio puntaje de 0 a 3, donde 0 representó la ausencia de inmunotinción en las células teñidas (negativa hasta 5%), uno (6–25%), dos (26–50 %) y tres (más del 50%) . Los resultados se sometieron a la consideración de dos observadores para emitir la evaluación final.

#### 2.5 Evaluación de la seguridad

El monitoreo de la toxicidad aguda y subaguda se realizó en todos los pacientes por medio del examen físico general en todas las inmunizaciones y el control de los signos vitales previo al tratamiento y a las 2 horas de la administración del producto. Los eventos adversos (EAs) se clasificaron de acuerdo a los Criterios Comunes de Toxicidad (CTC) versión 02 para el ensayo por la vía IM (Anexo 6a) y a la CTC versión 03 para el ensayo por la vía SC (Anexo 6b).

#### 2.6. Tratamiento

##### 2.6.1 Naturaleza y presentación del preparado vacunal.

La vacuna, de naturaleza molecular, se obtuvo en la Dirección de Desarrollo del CIM. Está compuesta por el gangliósido NGlicolilGM3 (NeuGcGM3) incorporado hidrofóticamente al complejo de proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* donde se conforma, un proteoliposoma de muy pequeño tamaño (VSSP) (del inglés *very small size proteoliposome*). El gangliósido se obtuvo a partir de eritrocitos de caballo, por una modificación del método de Folch

(Folch y cols., 1957). La vacuna NeuGcGM3 /VSSP se presentó en bulbos de vidrio 2R Norma DIN 58 366, transparentes, incoloros, con capacidad para 2 ml, y tapa slip-off color blanco con tapón de goma calidad farmacéutica inyectable según la norma correspondiente etiquetados como “preparado vacunal”, con un contenido de 0,5 ml de la solución estéril de la vacuna con aspecto transparente, libre de partículas sedimentables, disueltos en una solución tampón, de Tris-(hidroximetil)-aminometano (0,97 mg) y ácido clorhídrico (0,09 mg) en agua para inyección (csp 0,50 ml). Se presenta a una concentración de  $0.61 \pm 0,2$  mg/ml de NeuGcGM3. El mismo tipo de envase se utilizó tanto cuando la vacuna se administró por vía subcutánea como por la vía intramuscular.

El Montanide ISA 51 (para la administración del preparado vacunal por la vía IM) se presentó en bulbos 2R con 0,3 ml/ de Montanide Isa 51 norma DIN 58366 de vidrio color ámbar neutro en masa y en la superficie, clase hidrolítica I con tapón de, goma de 13 mm calidad farmacéutica inyectable, retapa flip off de 13 mm color azul, etiquetados como “Adyuvante” con 0,5 ml del producto estéril, color amarillo claro, transparente y viscosidad media. Compuesto por aceite mineral 92/88 (Drakeol 6VR) (peso %) y octadronato de Manitol anhidro (Montanide 80) 8/12 (peso %). Ambos bulbos se conservaron a temperatura entre 2-8° C evitando su congelación.

Los lotes de vacuna se prepararon de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura del Centro de Inmunología Molecular (Estévez y cols., 2000).

#### *2.6.2 Justificación de las dosis a emplear.*

La selección de los niveles de dosis se realizó de acuerdo a los resultados de los estudios preclínicos de toxicidad a dosis repetidas, realizados en ratas Cexp. Sprague-Dawley. Estos estudios mostraron un perfil de seguridad de dosis hasta 10 veces mayor a la solicitada para evaluar en humanos, tanto para la vía IM como la SC. (Informe toxicidad NeuGcGM3. Cenpalab, julio 2003)

### 2.6.3 Disponibilidad del preparado vacunal:

Las vacunas se suministraron por el Departamento de Inmunofarmacología del CIM a los farmacéuticos responsables de la contabilidad de los productos de investigación en cada centro. Se entregaron a los investigadores responsables en el momento del tratamiento de cada paciente y mediante la receta correspondiente. Los bulbos presentaban una etiqueta con la especificación "Para Ensayo Clínico" y datos referentes a: nombre, número de lote de producción, concentración de gangliósido, fecha de fabricación, fecha de vencimiento y temperatura de almacenamiento.

### 2.6.4 Cálculo del volumen a administrar según nivel de dosis:

Este cálculo se realizó siempre por el promotor de acuerdo a la concentración de los bulbos y se envió por escrito con la documentación de cada lote por medio de una planilla confeccionada por los productores y aprobada por el Departamento de Aseguramiento de la Calidad del CIM. El Investigador revisó los datos cuidadosamente antes de la administración a cada nuevo paciente.

### 2.6.5 Metodología de la administración intramuscular:

- El volumen a administrar de la formulación vacunal se extrajo a través de la tapa de goma del bulbo con jeringuilla desechable de 2 ml, atóxica y libre de pirógenos. Los bulbos se desecharon luego de ser utilizados.
- Para la preparación de la emulsión vacuna/Montanide ISA 51 se procedió a inyectar el contenido del bulbo de la vacuna en el bulbo del Montanide ISA 51 agitando repetidas veces. Además, se inyectó y eyectó hasta 10 veces la mezcla con el objetivo de obtener una emulsión final homogénea de donde se tomó el volumen a administrar.
- El volumen calculado previamente de acuerdo al lote (según las especificaciones del productor) se cargó en jeringuilla de 2 ml de 1/10, sin émbolo de goma (para evitar la

reacción de la goma con el adyuvante oleoso)

- Esta jeringuilla se usó en el proceso de administración de la vacuna pero con diferente aguja.
- La administración se realizó por la vía intramuscular en la región deltoidea, siempre que no hubiera vaciamiento ganglionar, con agujas calibre 20G siguiendo las normas de esterilidad y asepsia adecuadas.

En caso necesario, se administraron otros tratamientos concomitantes o concurrentes con medicamentos no oncoespecíficos, tales como: analgésicos, antipiréticos, (Dipirona 600 mg por vía IM), antihistamínicos (Difenhidramina 20 mg IM), antieméticos: (Metoclopramida 10 mg IM) y otros de soporte paliativo, además de los tratamientos de control de enfermedades crónicas como Hipertensión arterial, Diabetes Mellitus, etc. El carro de paro estuvo presente en todas las inmunizaciones para hacer frente a cualquier evento adverso grave.

#### 2.6.6 Metodología de la administración subcutánea

- El volumen a administrar se cargó en jeringuilla de 1ml de 1/100 ó 2 ml de 1/10, se aseguró el volumen necesario según la dosis, con aguja 23 G. Esta jeringuilla también se usó en el proceso de administración de la vacuna pero con diferente aguja.
- El preparado vacunal se inyectó por vía subcutánea, con agujas calibre 26G, siguiendo las normas de esterilidad y asepsia.
- En los casos que el volumen a administrar sobrepasara 1 ml, se dividió en subdosis y su administración se realizó en sitios anatómicos diferentes, excepto en aquellos donde existía vaciamiento ganglionar previo, se siguió el siguiente orden de preferencia:
  - a) Extremidades superiores, (antebrazo y brazo).
  - b) Extremidades inferiores (región posterior de la pierna).



c) Regiones para vertebrales dorsales.

- El o los sitios escogidos para la administración de la vacuna se mantuvieron durante todo el tratamiento de cada paciente
- Al igual que en el protocolo de administración IM, se tomaron medidas para hacer frente a eventos adversos severos o muy severos.

#### 2.6.7 Esquema de inmunización

En ambos estudios los pacientes recibieron las primeras 5 dosis cada 14 días (fase de inducción) y el resto cada 28 días (re- inmunizaciones) hasta completar 9 en el caso del primer estudio y 15 en el segundo ensayo clínico. Se continuaron la re- inmunizaciones previa aprobación del paciente en caso de observarse respuesta objetiva, o en caso de progresión, pero sin compromiso de la capacidad funcional.

#### 2.7 Evaluación de la respuesta antitumoral

La evaluación de la respuesta anti-tumoral se realizó cada cuatro meses por medio del examen físico, exámenes complementarios de laboratorio clínico y estudios imagenológicos (Tomografía axial computarizada según sitio de metástasis y de cráneo para descartar metástasis cerebrales, Radiografía de Tórax, Ecografía abdominal y de partes blandas según un cronograma confeccionado al efecto. Los resultados para la evaluación de la respuesta antitumoral para tumores sólidos se clasificaron según el Criterio de Respuesta para la Evaluación de Tumores Sólidos Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST, por sus siglas en inglés) versión del año 2000 (anexo 7). El seguimiento clínico se efectuó hasta el fallecimiento del paciente a partir de la inclusión en el ensayo.

##### 2.7.1 Documentación de Eventos Adversos (EAs) y respuesta antitumoral.

Para optimizar la recogida de datos sobre los EAs, se entregó a todos los pacientes un modelo confeccionado al efecto para el control de los mismos después de las 2 horas de inmunización y hasta la próxima consulta, los cuales eran incorporados a la historia clínica del paciente y al registro de EAs del Cuaderno de recogida de datos (CRD) en el acápite correspondiente a cada inmunización (anexo 8). Siempre que fue posible se documentaron los eventos por medio de fotografías digitales realizadas a los pacientes en el sitio de investigación y en el caso de la respuesta antitumoral por medio de imágenes (TAC).

## 2.8. Evaluación de la respuesta inmune

### 2.8.1 Inmunidad humoral

En este estudio sólo se evaluó la inmunidad humoral. Se consideraron positivos los títulos por encima de 1/80. Las muestras de sangre se recogieron antes de la primera inmunización (día 0), día 56 (final del período de inducción) y cada 2 meses hasta completar el año de tratamiento) y se procesaron en las instalaciones del laboratorio de Inmunología del INOR y el Departamento de Vacunas del CIM. Se extrajeron 10 ml de sangre para los estudios humorales en tubo sin heparinizar, se incubaron durante 1 hora a 37 ° C y luego a 4 ° C durante 30 min, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a TA. Los sueros así obtenidos se conservaron a -20° C para su posterior utilización, separados en alícuotas de 1 o 2 ml. La evaluación de la respuesta anti-gangliósido se realizó por un ensayo inmunoenzimático, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, por sus siglas en inglés). Brevemente: los gangliósidos (NeuGcGM3, NeuAcGM3 y NeuGcGM2) (200 ng/pozo) en 50µl de metanol, se secaron en placas de poliestireno de 96 pozos (*PolySorp, Nunc, Dinamarca*) por 90 min a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron con solución tampón fosfato salino con Tween 20 (0.05% vol/vol). Las muestras de suero se incubaron toda la noche a TA. Después de lavadas con el mismo buffer, se les agregó anti IgM, IgG o IgA humana biotinilada. Estos 3 Acs se generaron

en cabras (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA*), incubándose por 1,5 horas a 37°C. Después de un nuevo lavado, se añadió la fosfatasa alcalina conjugada con Estreptavidina (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA*) en las mismas condiciones de incubación. Las placas se lavaron otra vez y se añadió como sustrato p-nitrofenilfosfato (*Sigma Chemical Co, St Louis, MO*) en solución buffer dietanolamina (pH 9.8) y se incubaron por 30 min. Las absorbancias se midieron a 405 nm con un lector ELISA (*Organon Teknika, Salzburg, Austria*)

### 2.9. Aseguramiento de la calidad.

Los estudios imagenológicos (Sonografía y Rx) se realizaron en el Servicio de Imagenología del INOR; los estudios de TAC en el Instituto de Neurología, en el Hospital Hermanos Ameijeiras (HHA) o en el Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ). Los laboratorios clínicos del INOR y del HUD Celestino Hernández Robau realizaron los estudios hemoquímicos y de hematología. Se completaron 30 monitoreos por parte del centro promotor para comprobar la calidad de los datos. El EC con la vacuna administrada por la vía IM no recibió auditorías. El segundo ensayo, con la vacuna administrada por la vía SC recibió dos, ambas por parte del Centro Coordinador Nacional de Ensayos Clínicos (CENCEC) y el CIM, respectivamente. Existieron intercambios mensuales entre los investigadores clínicos y los del centro promotor a través de la comunicación personal, correo electrónico y la realización de varios talleres clínicos: de inicio del estudio, de discusión clínica de la marcha del ensayo y del final del estudio. El preparado vacunal se elaboró y se entregó por el centro promotor (CIM) a las instituciones hospitalarias de acuerdo a los Programas de Aseguramiento de la Calidad en los Ensayos Clínicos (PACEC) del CIM y fue tratado como producto de Investigación en los departamentos de farmacia de ambas instituciones según establecen las normas de las ICH.

### 2.10 Métodos Estadísticos Utilizados y Tamaño de Muestra

### 2.10.1 Variables descriptivas generales relacionadas con las características particulares del paciente

Edad, sexo, localización del tumor primario y las metástasis, metástasis resecaadas o no, tratamiento previo, capacidad funcional (*PS*, por sus siglas en inglés), estado de la enfermedad al momento de la inclusión y número de dosis recibidas.

#### Variables principales de respuesta:

- Toxicidad
- Respuesta inmune humoral.

#### Variables secundarias relacionadas con la respuesta clínica:

- Respuesta clínica antitumoral y tasa de SV global
- Tasa de SV global

### 2.10.2 Análisis y pruebas estadísticas realizadas con las diferentes variables del ensayo.

<b>Variable</b>	<b>Tipo de análisis</b>
Variables descriptivas	Media, mediana, porcentos y rangos.
Supervivencia Global	Tasa de supervivencia a diferentes tiempos, Métodos de Kaplan Meier y el estadígrafo de Log-rank para Comparaciones de curvas de SV.
Respuesta inmune humoral	Prueba de Duncan para comparaciones múltiples Análisis de varianza de Donovan
Toxicidad	Frecuencia y grado de intensidad según CTC versiones 02-03

Para determinar la relación entre la respuesta clínica y otras variables pronósticas (vía de administración, nivel de dosis, títulos de anticuerpos), se realizó un análisis de tablas de contingencia mediante la prueba Chi-cuadrado de independencia. Se utilizó un nivel de significación de 0,05 para todas las pruebas de comparación estadística utilizadas. La toxicidad y la respuesta antitumoral se evaluaron de acuerdo a un análisis por intención a tratar.

#### ***Determinación del Tamaño de la muestra***

El tamaño de la muestra por tratarse de ensayos Fase Ib/IIa no se calculó previamente. El primer estudio NeuGcGM3/VSSP/Montanide ISA 51 por la vía IM se previó inicialmente con 10 pacientes por cada nivel de dosis. Adicionalmente, se incluyeron dos pacientes en el primer nivel de dosis, para un total de 22 pacientes en el ensayo. El segundo estudio NeuGcGM3/VSSP por vía SC incluyó 20 pacientes distribuidos en grupos de 5 pacientes cada uno según los niveles de dosis estudiados. Posteriormente se realizó una extensión de este ensayo clínico para ampliar el estudio del nivel de 900 µg e incluir 2 niveles de dosis adicionales, (1200 µg y 1500 µg) con el fin de ampliar la búsqueda de la DMT y la dosis óptima de la formulación vacunal, lo que resultó en un total de 35 pacientes en este ensayo.

#### ***Método de procesamiento de los datos***

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 para Windows.

CAPITULO 3. EXPRESION DEL GANGLIÓSIDO NeuGcGM3 EN TUMORES PRIMARIOS Y  
EN METÁSTASIS DE PACIENTES CON MELANOMA

## INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de melanoma resulta en ocasiones un reto. Requiere de un número de variables interrelacionadas entre sí, que en su conjunto afirman el diagnóstico anátomo patológico de la enfermedad. Ninguna aisladamente tiene valor diagnóstico absoluto. Ellas son, la *Descripción clínica de las lesiones y sus formas de presentación en el paciente*, la *Morfología*, y por último la *Inmunohistoquímica*. Esta última variante permite el diagnóstico diferencial del melanoma amelánico con otros tumores a través de la identificación de su origen en el melanocito por medio de los marcadores moleculares de estas células. No constituye un elemento indispensable para afirmar el diagnóstico de rutina en el caso del melanoma melánico. Sin embargo, el uso de esta técnica se ha generalizado debido a que resulta particularmente útil en la identificación de moléculas o marcadores biológicos de utilidad terapéutica o pronóstica en esta enfermedad (Rosai, 2011).

### *Los Gangliósidos.*

Son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico, y están ampliamente distribuidos en los tejidos humanos de origen neuroectodérmico, tanto normales como tumorales (Yamashita y cols., 1999). Se han considerado blancos atractivos para la inmunoterapia y el diagnóstico del cáncer debido a su alta expresión en los tumores en comparación con los tejidos normales, además de su conocida relevancia en el crecimiento tumoral (Zhang y cols., 1997). Se conoce que NeuAcGM3 (GM3), NeuAcGM2 (GM2), y NeuAcGD3 (GD3) son los gangliósidos predominantes en la mayoría de las muestras de queratinocitos, aunque los estudios inmunohistoquímicos realizados con el uso de los AcMs anti-GM3 (M2590) y anti-GD3 (R24) mostraron justamente un débil reconocimiento por esas células. Los gangliósidos del tumor se liberan al microambiente tumoral y se unen eficientemente a las células del huésped que se

encuentran en este microambiente (Liu y cols., 2006). El ácido N-glicolil neuramínico normalmente no se expresa en los queratinocitos normales y está ausente debido a una delección parcial del gen que codifica la producción de la hidroxilasa CMP-Neu5Ac (Irie y cols., 1998; Kawai y cols., 1991); sin embargo, en varias neoplasias malignas se describe la presencia de los gangliósidos N-glicolilados (Watarai y cols., 1995; Carr y cols., 2000; Vázquez y cols., 1995; Marquina y cols., 1996).

### *El AcM 14F7*

Es un AcM anti- NeuGcGM3 de tipo IgG1 que, a diferencia de los demás AcM antigangliósidos, es altamente específico para este gangliósido. Se generó a partir de la inmunización de ratones Balb/c con NeuGcGM3 /VLDL es decir, lipoproteínas de muy baja densidad (*del inglés very low density lipoprotein*). Este AcM reconoció algunos tumores malignos de mama y melanoma (Carr y cols., 2000), sin embargo, no identificó otros tumores de la piel, lo que sugiere la relación de la reactividad de este AcM con la agresividad que caracteriza a la biología del melanoma. Así mismo, mostró inmunotinción en tumores del sistema genitourinario (próstata, vejiga y ovario) (Blanco y cols., 2011a) y en los del sistema digestivo (estómago, colon, recto, páncreas, hígado y unión gastroesofágica) (Blanco y cols., 2011b).

Los resultados iniciales de reconocimiento del AcM anti- NeuGcGM3 en melanoma y no en otros tumores de la piel sustentaron su uso en este estudio para evaluar la presencia del gangliósido en las muestras de melanoma primario, metástasis ganglionares de melanoma y metástasis a distancia de este tumor.

### *3.1 Resultados*

La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio presentaban melanomas melánicos (51/57). Se realizaron estudios IHQ solo en el subgrupo de pacientes donde el tumor primario no estaba presente y en aquellos con melanoma amelanico. (6/57) La evaluación de la expresión del



gangliósido NeuGcGM3 se realizó a través de la tinción con el AcM 14F7 en un total de 29 biopsias de melanomas primarios y en 7 de ganglios metastásicos. Estas muestras correspondieron a tumores de los pacientes incluidos en los dos ensayos clínicos que componen este estudio. Adicionalmente, se estudiaron 9 muestras de piel normal proveniente de individuos sanos y de las zonas adyacentes a los melanomas. La tabla 1 resume los resultados. No pudo estudiarse la expresión del gangliósido en las metástasis a distancia (a pesar de que estas fueron totalmente resecadas en 10 pacientes) porque no se dispuso de las muestras necesarias. Esto se debió fundamentalmente a: 1) sólo se disponía de 6 bloques pertenecientes a pacientes del INOR. 2) los bloques de parafina no reunían las condiciones necesarias para realizar los estudios de IHQ y 3) hubo en algunos casos agotamiento de las muestras tumorales por estudios histopatológicos previos.

### *3.1.1 Expresión de NeuGcGM3: melanoma primario, metástasis ganglionar y piel normal.*

La piel normal adyacente al melanoma cutáneo y la de individuos sanos no evidenció reactividad con el AcM 14F7 (fig. 1B), mientras que las células de los melanomas primarios exhibieron una intensa tinción en la membrana y en el citoplasma. Un caso de melanoma uveal exhibió una tinción heterogénea de moderada a intensa. Se observó un patrón de reconocimiento intenso, homogéneo y finamente granular en todos los casos de melanoma maligno cutáneo estudiados (28/28). Veintisiete de ellos eran melánicos y sólo uno amelánico. La reacción se localizó principalmente en la membrana plasmática en más del 50% de los melanocitos malignos aunque también pudo observarse una tinción citoplasmática (fig. 1D).

### *3.1.2 Metástasis en ganglios linfáticos.*

Se observó reactividad al AcM 14F7 de moderada a intensa en más del 50% de las células tumorales en 6/7 ganglios linfáticos metastásicos (85.7%). El reconocimiento del 14F7 fue homogéneo, finamente granular, y localizado en la membrana y el citoplasma de los melanocitos

malignos (fig.1F). Una de las muestras evidenció un patrón de reconocimiento heterogéneo con reacción moderada al AcM 14F7 entre el 6-25% de las células malignas.

### *3.2 Discusión*

El ácido N-glicolilneuramínico está ausente de los tejidos normales debido a una eliminación parcial del gen que codifica la producción de CMP-Neu 5Acetil hidroxilasa (Irie y cols., 1998; Kawai y cols., 1991). La expresión de los residuos de gangliósidos N-glicolilados en las células neoplásicas ha sido asociada con su incorporación a través de la dieta y al metabolismo acelerado de estas células (Tangvoranuntakul y cols., 2003; Bardor y cols., 2005). Muchos autores han sugerido una vía alternativa a la síntesis de Neu5Gc a partir de otros intermediarios del metabolismo celular en algunos tumores malignos humanos (Bardor y cols., 2005). En este estudio se confirmó la ausencia de reactividad del AcM 14F7 en muestras de piel normal tal y como fue publicado previamente (Carr y cols., 2000). Este resultado es consistente con la ausencia de la función N-glicolilada en los queratinocitos normales. Se conoce que el gangliósido NeuAcGM3 es un componente normal de la membrana plasmática de las células normales humanas incluidos los queratinocitos (Carubia y cols., 1984; Dippold y cols., 1985; Kowla y cols., 2002), de esta manera se sustenta que el AcM 14F7 es capaz de distinguir entre las funciones N-Glicolil y N-acetil del gangliósido GM3.

El más estudiado de los gangliósidos es la variante N acetilada del ácido Siálico, antígeno presente en los tejidos normales humanos (Carubia y cols., 1984; Dippold y cols., 1985; Kowla y cols., 2002); por el contrario, el antígeno Hanganutziu –Deicher (HD) no se encuentra en los tejidos normales humanos pero puede estar presente en una variedad de células malignas humanas incluyendo al melanoma. El antígeno HD es un antígeno heterófilo químicamente definido como un glicoconjugado (gangliósido o glicoproteína) que contiene ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc) (Nakarai y cols., 1990). Kawachi y Saida sugirieron que el antígeno

HD está expresado en las cadenas de carbohidrato de las glicoproteínas de los melanomas, pero no en las de los gangliósidos presentes en este tumor humano (Kawachi y cols., 1992). Recientemente Blanco y cols. demostraron que la expresión de los gangliósidos en tejidos frescos se encuentra localizada en la membrana celular, a diferencia de lo que se observa en los fijados en parafina, donde se encuentra expresado en el citoplasma y la membrana. Esto se debe a que los sistemas de inclusión en parafina pueden movilizar los gangliósidos de la membrana al compartimiento citoplasmático. (Blanco y cols., artículo en publicación, 2012). La evaluación de glicolípidos en los tumores se realiza con métodos de extracción diferentes al de las glicoproteínas. En el caso de los primeros, el no reconocimiento previo del gangliósido pudo deberse a una remoción parcial o total de los glicolípidos del tumor, pues estas moléculas se extraen de los tejidos después del tratamiento con los solventes orgánicos generalmente utilizados como parte de los procedimientos de inclusión de las muestras de tejido en parafina (Bodd y cols., 1990).

El reconocimiento del AcM 14F7 en el melanoma maligno primario y sus metástasis linfáticas, así como, su limitada reacción en los tejidos normales sustenta la idea del uso de este antígeno como blanco terapéutico para la inmunoterapia activa y pasiva en esta neoplasia. Fue imposible realizar el estudio de la expresión del gangliósido en las metástasis a distancia, por no disponer de las muestras necesarias en condiciones óptimas y además por la baja frecuencia de realización de metastasectomías en nuestro medio.

### 3.3 Conclusiones

- El gangliósido NeuGcGM3 se expresa en los melanomas primarios y sus metástasis locorregionales, lo cual indica que puede ser un blanco terapéutico para la utilización de la inmunoterapia en esta enfermedad.

CAPITULO 4. ENSAYO CLINICO FASE Ib/IIa CON LA FORMULACION VACUNAL  
NeuGcGM3/VSSP /MONTANIDE ISA 51 POR LA VIA IM EN PACIENTES CON MELANOMA  
AVANZADO CUTANEO Y OCULAR

## INTRODUCCIÓN

Este estudio unicéntrico, abierto, no controlado y secuencial, incluyó 22 pacientes provenientes del INOR y utilizó el preparado vacunal por vía IM adyuvado con Montanide ISA 51 (Seppic, Francia) en dos dosis: 12 pacientes recibieron 0.2 mg y 10 pacientes 0.4 mg.

### *Esquema de inmunización.*

En este caso se estableció que los pacientes recibieran 9 dosis de la vacuna en total durante el ensayo, las primeras cinco dosis cada 14 días y el resto cada 28 (gráfico 2). Excepcionalmente, con la aprobación del comité de ética para la investigación del INOR, un grupo de enfermos con evidencias de respuesta objetiva o en progresión de la enfermedad, pero con capacidad funcional conservada ( $\leq 2$ ), recibió 15 dosis o más de la vacuna, siempre con la misma frecuencia de administración. Se permitió la exéresis paliativa de metástasis en caso de progresión, sin que se interrumpiera el esquema de inmunización. Los pacientes no recibieron ninguna otra forma de tratamiento oncoespecífico después de ser incluidos en el estudio.

### *4.1 Resultados*

Desde octubre del 2000 hasta octubre del 2002 veintidós pacientes se incluyeron en el estudio. Dieciocho de ellos se consideraron evaluables y 4 no lo fueron por no completar el período de inducción del tratamiento debido al rápido progreso de la enfermedad. Las características generales se muestran en la [tabla 2](#). Todos presentaron melanoma avanzado, 16 de ellos con tumor primario cutáneo y en cuatro, ocular específicamente de origen coroideo. En dos de los enfermos no fue posible localizar la lesión primaria ya que existía el antecedente de la exéresis previa de una lesión que no fue biopsiada. Al momento de la inclusión, 20 de 22 pacientes presentaron volumen tumoral considerable, sólo en dos de ellos las metástasis habían sido totalmente reseadas. Todos los pacientes incluidos tuvieron capacidad funcional con grado entre cero y uno de acuerdo a la escala de la OMS. La edad media de todo el grupo fue de 50.6

años, con una mediana de 53 años en un rango de 24 a 74 años de edad. En cuanto a la clasificación del sitio metastásico, según el TNM de la AJCC del 2002 (anexo 1), cinco pacientes presentaron melanoma avanzado localmente e irreseccable en piel, TCS y ganglios o en miembros inferiores o superiores y en cinco las metástasis se encontraban limitadas a la piel y TCS (estadificadas como M1a); en seis fueron M1b (metástasis en pulmón) y se encontraban asociadas a metástasis en piel, pero se consideraron en el grupo de metástasis en pulmón debido a su peor pronóstico. Seis pacientes se clasificaron M1c (metástasis en otras vísceras y hueso). En este estudio no fue posible medir los valores de la LDH necesarios para establecer correctamente la etapa. Al momento de la inclusión, la enfermedad en progresión predominó en ambos grupos. Dieciocho en total, 11 en el primer nivel de dosis y siete en el segundo nivel.

La Cirugía fue el tratamiento primario en todos los pacientes (22/22). En cada grupo, un paciente recibió IFN a bajas dosis y poliquimioterapia respectivamente previos a la vacunación. El número total de dosis de vacuna recibidas fue similar en ambos niveles de dosis. Trece pacientes recibieron más de 10 dosis, al mantener su estado general dentro de los límites aceptados por el protocolo del ensayo clínico.

#### 4.1.1 Análisis de la seguridad.

Todos los pacientes desarrollaron eventos adversos (EAs) grado I-II en el curso de las inmunizaciones. Se reportaron un total de 331 EAs relacionados. La tabla 3 muestra sus características. Fueron de 3 tipos: **Locales**: Dolor y signos inflamatorios en el sitio de inyección; **Sistémicos**: fiebre, escalofríos, mialgia, cefaleas, compatibles con el cuadro pseudo gripal característico de la Bioterapia y **Cambios cutáneos** como la despigmentación y el Vitiligo. El perfil de toxicidad fue evidentemente más amplio en el nivel de dosis de 400 µg con algunos reportes de EAs grado III. En este nivel la toxicidad sistémica relacionada con el preparado

vacunal fue más frecuente e intensa, así como las reacciones locales. Se observó necrosis con abscedación de la región deltoidea en un paciente que obligó a cambiar el sitio de inmunización. La toxicidad gastrointestinal manifestada por náuseas y vómitos fue más intensa también en este nivel. Estos eventos fueron reversibles y tratados con Metoclopramida 10 mg IM. Se observó inflamación en las lesiones tumorales relacionada con las inmunizaciones en 2 casos, uno en cada nivel de dosis. Por otro lado, 2 pacientes presentaron reacciones de hipersensibilidad, manifestadas por hipotensión, ansiedad, taquicardia de corta duración y reversible con la medicación, también uno en cada nivel de dosis. Ambos eventos remitieron al administrar Dipirona 600 mg IM, Difenhidramina 20 mg IV e hidratación parenteral. Los cambios cutáneos observados, compatibles con despigmentación y Vitiligo aparecieron en 3 pacientes durante las inmunizaciones; en uno de ellos, hubo halos de despigmentación en lesiones cutáneas en regresión, (fig. 2) y en otros 2 pacientes vitiligo generalizado (fig. 3). En la paciente 01 se observó respuesta mixta de las lesiones cutáneas: desaparición de algunas (en este caso asociadas a los halos de despigmentación) junto a la progresión y estabilización de otras.

#### *4.1.2 Respuesta Inmune.*

##### *Respuesta de Acs contra el gangliósido NeuGcGM3*

En siete de los 18 pacientes evaluables para la inmunogenicidad, se detectaron niveles bajos de Acs IgM e IgG previos a la inmunización. En 14 de 18 pacientes se mostraron respuestas de Acs de tipo IgM, IgG e IgA. En el primer nivel de dosis, 67% de los pacientes mostró títulos IgM e IgG por encima de 1280 (rango máximo de 1: 280 a 1: 5120). El 78% de los pacientes del segundo nivel de dosis los desarrolló por encima de 1: 2560 (rango máximo de 1:2560 a 1: 20480). El 33 % de los pacientes en este mismo nivel presentó títulos de Acs anti NeuGcGM3 de tipo IgA superiores a 1:1280. Las figs. 4a, 4b y 4c muestran el inverso de los títulos de Acs pre

y post inmunización en los pacientes vacunados que recibieron más de 5 inmunizaciones. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas de las medias aritméticas durante el período de inmunización entre los 2 niveles de dosis para IgM ( $p=0.44$ ); IgG ( $p=0.401$ ) e IgA, ( $p=0.462$ ) (Prueba U de Mann Whitney). Se detectó respuesta de anticuerpos para otros gangliósidos como NeuAcGM2 y NeuAcGM3 (Fig.5). El valor de la absorbancia (405nm) contra NeuAcGM3 y NeuAcGM2 fue menor en el primer nivel de dosis, no obstante, se observaron altas desviaciones estándar en ambos grupos. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre las medias aritméticas ( $p<0.05$ ) solamente en la cuarta semana para NeuAcGM3 y en la octava semana para NeuAcGM2. Los máximos títulos de IgM en respuesta al gangliósido NeuAcGM3 se detectaron más temprano que para NeuAcGM2

#### 4.1.3 Respuesta antitumoral y desarrollo de vitíligo.

La respuesta antitumoral obtenida de forma global se muestra en la tabla 4. Ocho pacientes de 18 evaluables presentaron respuestas objetivas al tratamiento (44%) y 36,4% de los 22 incluidos en el ensayo (según intención a tratar). En tres de ellos el diagnóstico era de melanoma uveal (pacientes 15, 16 y 18). En el primer nivel de dosis, un paciente obtuvo respuesta parcial de la enfermedad con desaparición de las metástasis pulmonares que duró 12 meses, desafortunadamente, no disponemos de los estudios de TAC para el reporte del caso. Tres pacientes (02, 03 y 05) presentaron estabilización de la enfermedad entre 18 a más de 25 meses. En dos de estos enfermos (03 y 05) fue necesaria la cirugía de carácter sanitario (amputación de miembro inferior) y se mantienen vivos actualmente con una supervivencia de 143 y 133 meses, respectivamente. El otro paciente (02), mantuvo estabilización de una metástasis pulmonar voluminosa en el LSD por espacio de 18 meses con PS=1. Algunos de estos pacientes se describirán en detalle en el capítulo correspondiente al reporte de casos. En el segundo nivel de dosis una paciente (paciente 11) con resección total de metástasis en piel previa a su inclusión, se mantiene libre de enfermedad (RC) 138 meses después. Un paciente



con melanoma ocular localmente avanzado presentó estabilización de la enfermedad por espacio de 7 meses. Otros dos pacientes (16 y 18) también con melanoma ocular coroides con metástasis cutáneas a distancia resecaadas totalmente en uno y el otro con lesiones óseas múltiples no confirmadas histológicamente (detectadas y evolucionadas por gammagrafía ósea) obtuvieron estabilización de la enfermedad de larga duración (25 y 127 meses respectivamente). En los pacientes restantes la progresión de la enfermedad se mantuvo todo el tiempo.

Tres enfermos en el primer nivel de dosis (01, 04 y 05) presentaron manifestaciones de auto inmunidad en forma de despigmentación cutánea y/o vitiligo ya mencionados en el acápite del análisis de la toxicidad. En la actualidad, cuatro pacientes de 22 incluidos en el estudio permanecen vivos. Al analizar la relación entre la respuesta preinmune IgG e IgM (títulos iguales o mayores que 1/80) y la respuesta clínica alcanzada con la vacunación, no se obtuvieron diferencias significativas ( $p=0,225$ ) y ( $p=0,182$ ) respectivamente, por el estadígrafo  $\chi$  cuadrado. Los valores de las muestras que cumplían estas consideraciones fueron muy pequeños.

#### *4.1.4 Supervivencia en pacientes inmunizados con NeuGcGM3/VSSP/Montanide ISA 51*

A pesar de que no era un objetivo en este estudio Fase I, los resultados de la SV desde el diagnóstico del estado avanzado irresecaable o metastásico en los pacientes con melanoma uveal o cutáneo, inmunizados por vía IM y según el test de Log Rank resultan de interés. Del total de pacientes incluidos (22) hubo una mediana de SV desde el diagnóstico de la enfermedad avanzada de 21 meses con tasa de SV al año de 68.18% (15/22) y de 36,4% (8/22) a los 2 años. Se realizó otro análisis de la SV con la exclusión de los cuatro pacientes con melanoma de coroides para dar mayor homogeneidad al grupo y los resultados al año fueron de 61% al año , de 33% a los dos años y para los tres, cuatro y cinco años del 17% (3/18) (tabla 5). Las medianas de SV de los pacientes con títulos pre inmunes de Acs anti NeuGcGM3 de tipo IgG e IgM no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los que no presentaron

Acs preinmunes: ( $p=0,34$ ) y ( $p=0,14$ ), sin embargo, el pequeño número de estos dentro de los pacientes evaluables inmunológicamente limita cualquier comentario en este análisis estadístico. La obtención de algún grado de respuesta objetiva antitumoral en los pacientes con melanoma cutáneo avanzado irreseccable o metastásico (5/18) que recibieron el tratamiento por la vía IM se tradujo en un aumento en la SV con significación estadística respecto a los que presentaron progresión de la enfermedad ( $p=0,00$ ). Los pacientes que obtuvieron respuesta clínica aún no han alcanzado la mediana de SV después de 138 meses de seguimiento (fig. 6). Este parámetro no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,49$ ) en los pacientes con diferentes sitios de metástasis: piel, TCS, y ganglios (M1a), Pulmón (M1b) y visceral (M1c). Tampoco las hubo entre los dos niveles de dosis estudiados ( $p=0,34$ ), ni en la SV de los pacientes que desarrollaron con la inmunización títulos anti NeuGcGM3 de isotipo IgG o IgM superiores a la mediana de los títulos máximos para esas inmunoglobulinas ( $p=0,22$ ) y ( $p=0,13$ ) respectivamente.

#### *4.2 Discusión.*

El melanoma metastásico se conoce como una de las neoplasias más resistentes a la terapéutica y es aún una situación clínica sin solución definitiva (Agarwala, 2009b; Rosemberg y cols., 2011; Garbey cols., 2011; Rodabe y cols., 2011; Finn y cols., 2012; Spagnolo y Queirolo., 2012). Los resultados históricamente insuficientes de la Quimioterapia junto a la capacidad del tumor de responder a maniobras inmunológicas evidenciada por las remisiones espontáneas y las respuestas duraderas con el tratamiento con IL-2 llevan a la necesidad de encontrar formas de tratamiento más efectivas y menos tóxicas donde el sistema inmune del individuo sea el actor principal. La incorporación a la práctica oncológica del Ipilimumab y el Vemurafenib, significó un avance indiscutible en el panorama terapéutico de la enfermedad pero sin

cambiarlo de manera definitiva. (Hodi y cols., 2010; Chapman y cols., 2011; Flaherty y cols., 2011; Inman, 2011).

Sin lugar a dudas, la Inmunoterapia activa específica es una alternativa terapéutica menos comprometedora para el paciente con melanoma metastásico, conocida la estrecha relación de este tumor con el sistema inmune. En este estudio, la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP/Montanide ISA 51 administrada por la vía IM se evaluó en el marco de un EC Fase Ib/IIa con el conocimiento por un lado, de la expresión preliminar del antígeno NeuGcGM3 en el melanoma, y por otro, de la conocida capacidad inmunogénica de la formulación vacunal, que produjo Acs en ratones y pollos (Estévez y cols., 2000) y posteriormente en humanos, los cuales reconocían tumores que expresaban este Ag. Adicionalmente, sus sueros post inmunes tenían capacidad citotóxica (Carr y cols., 2003). Todo lo anterior sugirió la idea de la evaluación clínica de esta formulación vacunal en melanoma. En este EC, la vacuna mostró un amplio perfil de seguridad en ambos niveles de dosis estudiados. Todos los pacientes presentaron EAs; sin embargo, éstos fueron en su mayoría ligeros o moderados. No se identificó ninguna toxicidad limitante y el nivel de dosis de 200µg resultó el más tolerable. El DTIC, fármaco citotóxico hasta hace poco uno de los 2 únicos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico, presenta en comparación con esta vacuna un perfil de toxicidad más severo, que incluye además de la toxicidad local en caso de extravasación, la depresión medular, y emesis importante (Goodman and Gillman's., 2006; De Vita y cols., 2008; Martindale, 2009; Jones and Bartlet, 2010). La toxicidad de este fármaco se incrementa cuando se administra en esquemas de Poliquimioterapia. La IL-2, inmunoterapia aprobada también para el melanoma metastásico, presenta un perfil de seguridad muy estrecho; produce alteraciones en la permeabilidad capilar que causan un desequilibrio hemodinámico importante, con hipotensión que pone en peligro la vida además de síntomas generales y neuropsiquiátricos por lo cual se requiere la selección de

los pacientes, régimen de hospitalización, y que su administración se realice sólo por personal con experiencia en su uso y dominio de los programas de mitigación de riesgos (Atkins y cols., 1999). Un estudio realizado recientemente mostró la aceptación decreciente de este tratamiento entre los pacientes con melanoma tratados en instituciones norteamericanas del 2007 al 2010 (Dillman y cols., 2012). La formulación NeuGcGM3/VSSP/ Montanide ISA 51 no puso en peligro la vida de los pacientes tratados. Los cambios inflamatorios en el sitio de inmunización observados con la dosis de 0.4 mg pueden atribuirse al adyuvante oleoso utilizado, situación ya observada con otros preparados vacunales para terapias de cáncer o vacunas para contracepción que fueron adyuvadas con Montanide ISA 51 (Aucouturier y cols., 2002). Bada y cols. describieron previamente la induración y la inflamación en el sitio de la inmunización en un estudio con una formulación vacunal similar con el gangliósido NeuAcGM3 (NAcGM3 /VSSP/Montanide ISA 51) que se evaluó en ratas y monos con el Montanide ISA 51 como control. Esta formulación presentó este mismo tipo de toxicidad local incluso en los animales que recibieron sólo placebo junto al Montanide ISA 51 (Bada y cols., 2002; Bada y cols., 2005). No obstante todo lo anterior, resultó difícil determinar en este pequeño EC si la toxicidad local observada se debió exclusivamente al adyuvante oleoso empleado, a alguna reacción de idiosincrasia medicamentosa en los pacientes o si resultó exacerbada por la formulación vacunal en su conjunto. En general, los Eas observados en este EC son frecuentes en otras vacunas terapéuticas contra el cáncer (Schlom., 2012).

Se detectaron títulos de Acs preinmunes de isotipo IgG e IgM en algunos de los pacientes evaluables para la inmunogenicidad. A pesar de las implicaciones relacionadas con este hecho para la evolución clínica favorable de los pacientes con Melanoma que han sido descritas en la literatura (Pourtokalian y cols., 1991; Ravindranath y cols., 2007), esta muestra resultó pequeña para realizar cualquier análisis. La vacuna resultó inmunogénica e indujo respuesta de tipo humoral. La formulación utilizada es un proteoliposoma de muy pequeño tamaño (VSSP) donde

el gangliósido es incorporado hidrofóbicamente al complejo de proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* (Estévez y cols., 2000). Lowell y cols., describieron el uso de estas proteínas con antígenos peptídicos y sin adyuvantes (Lowell y cols., 1988). Al ser los gangliósidos menos inmunogénicos que las proteínas, en esta vacuna se decidió incorporar el adyuvante oleoso, dado que en los estudios pre clínicos realizados en ratones, de conocida tolerabilidad a los antígenos NeuGcGM3 y NeuAcGM3, se demostraron respuestas de Acs antigangliósidos de isotipo IgM e IgG con la adición del Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) o del Montanide ISA 51 (una forma altamente purificada del AIF) en la administración IM. En ambos niveles de dosis se identificaron anticuerpos de tipo IgM, IgG, e IgA, a pesar de tratarse de pacientes con enfermedad avanzada irrecable y metastásicos. Estos resultados de respuesta inmune se obtienen en pacientes con grandes volúmenes tumorales, donde es conocido el hecho de que la eficacia del tratamiento con vacunas es indirectamente proporcional al volumen tumoral (Gulley y cols., 2011). Se mantuvo la respuesta de anticuerpos de isotipo IgM con la inmunización por largos períodos, a diferencia de lo que ocurre con la vacunas de proteínas y péptidos donde la respuesta IgG es la que perdura en el tiempo (Marshall y cols., 2006). Los títulos obtenidos resultaron similares a los observados en pacientes con cáncer de mama en estadio IV tratados con la misma formulación vacunal (Carr y cols., 2003; Mulens y cols., 2010). La presencia de anticuerpos del tipo IgA sérico no tuvo una correlación clínica positiva en la evolución de los pacientes con melanoma uveal como describe la literatura, probablemente debido al pequeño número de pacientes con este tumor incluidos en el ensayo (Kotliansky, 1981). Adicionalmente se observó durante el período de inmunización la presencia de Acs de isotipo IgM contra otros gangliósidos presentes en el melanoma que son considerados Acs tumor- asociados, es decir, NeuAcGM3 y NeuAcGM2 (Zhang y cols., 1997; Thompson, 2004). Esto pudiera considerarse una manifestación de cierto grado de restauración de la inmunocompetencia de los individuos. La eliminación de los gangliósidos, moléculas de

conocida acción inmunosupresora (Mc Kallip, 1999; de León y cols., 2006; 2008) del microambiente tumoral y de la circulación puede estar propiciada por los Acs antigangliósidos de isotipo IgM (inmunoglobulina pentavalente) e IgG generados en el proceso de inmunización. Estos Acs serían capaces de secuestrar los gangliósidos circulantes y realizar una función citotóxica que puede favorecer la disminución del crecimiento tumoral (Ravindranath, 1998; 2007). Se ha descrito que los Acs generados en la vacunación con NeuGcGM3/ VSSP tienen capacidad citotóxica mediada por complemento e independiente de éste y adicionalmente, y que favorecen la citotoxicidad mediada por células, esta última debido al subtipo IgG1 e IgG3 de Acs generado por la inmunización (Carr y cols., 2003). Además de lo anterior, Labrada y cols., aportaron posteriormente evidencias donde relacionan la aparición de la respuesta antitumoral con la participación de las poblaciones NK y CD8+ al vacunar con NeuGcGM3/VSSP y suprimir la aparición de metástasis en el modelo murino de metástasis pulmonares espontáneas del carcinoma de Lewis metastásico 3LL-122 (Labrada y cols., 2010). La participación de los diferentes componentes del sistema inmune provocada por NeuGcGM3/VSSP pudiera favorecer la restauración de la competencia del sistema inmune y por ende contribuir al enlentecimiento de la progresión tumoral con la aparición de un estado de “coexistencia en equilibrio” entre el hospedero y el tumor que permite la prolongación de la supervivencia, como se observó en algunos de los pacientes en este estudio. En la práctica, esta ha sido una limitante histórica en los resultados de la inmunoterapia con vacunas, dados el volumen tumoral, la heterogeneidad del melanoma aún en pacientes con el mismo estadio clínico y el limitado número de células efectoras inducidas en el huésped por la vacunación, en contraste con los intensos mecanismos inmunosupresores presentes en el tumor (Klages y cols., 2010). En un menor volumen tumoral, estos mecanismos resultarían minimizados, por lo que sería posible esperar mayor efectividad con el tratamiento (Schlom, 2012). La combinación de estrategias de tratamiento con este fin y la personalización del mismo de acuerdo a las características no sólo del paciente sino del

tumor, parecen ser el camino a recorrer próximamente (Berinstein y cols., 2009; Madorski-Rodo y cols., 2012).

La aparición de vitíligo y halos de despigmentación es un evento descrito por primera vez para la vacuna NeuGcGM3 / VSSP. Se observó en el 13.6 % (3/22) de los pacientes inmunizados, frecuencia similar a la observada por Luiten y cols., quienes describieron 14% de casos de vitíligo con la vacunación utilizando células tumorales transducidas con GM-CSF autólogo en pacientes con melanoma metastásico (Luiten y cols, 2005). Gogas y cols., también lo publicaron con el uso de IFN a altas dosis (Gogas y cols., 2006). Se describió en las vacunas de células dendríticas con péptidos o antígenos de melanoma adyuvadas con IL-2, (Ranieri y cols., 2000) y Rosemberg previamente lo describió en pacientes con melanoma pero no lo observó en pacientes con carcinoma renal avanzado que recibieron el mismo tratamiento (Rosemberg ,1996). Por otra parte, no se observó con la vacuna GMK (Kirkwood y cols., 2001). El vitíligo tampoco apareció en las pacientes con cáncer de mama avanzado del ensayo clínico previamente citado donde se utilizó la formulación NeuGcGM3 / VSSP/ Montanide ISA 51 (Carr y cols., 2003). El inicio del vitíligo ocurrió posterior al proceso de la vacunación en todos los casos después de las primeras 5 dosis y continuó incrementándose aún después de terminado el tratamiento. Este hecho se reporta por primera vez en pacientes tratados con una vacuna molecular de gangliósidos; sin embargo, no se pudo vincular acertadamente con la respuesta clínica por ser muy limitado el número de sujetos. Dos de los 3 pacientes que lo desarrollaron obtuvieron supervivencias prolongadas. Las manifestaciones de autoinmunidad espontáneas o secundarias a la terapéutica en pacientes con melanoma, aparecen relacionadas con mejores resultados clínicos y sugieren la presencia de una respuesta inmune activa (Nordlung 1983; Maire y cols., 2011). En el caso del vitíligo relacionado con el tratamiento con IFN, apareció entre 3 y 12 meses después de iniciado el tratamiento según el primer reporte sobre el tema realizado por Gogas y cols. En general, se asocia en la mayoría de las publicaciones con

mejores resultados en la supervivencia libre de progresión y supervivencia global (Nordlung, 1983; Bystryn, 1987; Schallreuter, 1991; Rosemberg, 1996; Boasberg, 2006; Gogas y cols., 2010). Como se expresó con anterioridad, la aparición del vitiligo en esta serie resulta relevante por desarrollarse en el curso de la inmunoterapia activa específica con una formulación vacunal ajena a los antígenos melanocíticos, además de que es conocido que los gangliósidos no están relacionados con la síntesis de la melanina (Thompson y cols., 2004). Desafortunadamente, con estos resultados clínicos no es posible afirmar categóricamente que este hecho esté relacionado con un fenómeno de diversificación antigénica (del inglés "antigen spreading") o se deba a cierto grado de inmunorestauración asociada a la vacunación al no tener argumentos inmunológicos que lo confirmen. Sin embargo, los trabajos de De León y cols., muestran que NeuGcGM3 causa regulación negativa de los CD4 en los linfocitos T in vitro (De León y cols., 2006), por lo cual pudiera pensarse que los Acs generados con la inmunización son capaces de revertir esa regulación negativa y contribuir en cierto grado a la restauración de la inmunocompetencia del paciente (Ravindranath y cols., 2007). Lo anterior facilita la mejor presentación del Ag al sistema inmune y explicaría la inducción de respuestas de Acs contra otros gangliósidos diferentes a los presentes en la formulación vacunal. Los resultados presentados constituyen el primer reporte de vitiligo observado al inmunizar con una vacuna molecular de gangliósidos. El vitiligo es un proceso patológico en el cual los melanocitos son selectivamente destruidos como epifenómeno "impertinente" de autoreactividad (Hann y Kim, 1995). Los mecanismos de aparición de vitiligo en humanos después de la inmunoterapia se atribuyen a esta autoreactividad mediada por Acs y más recientemente, a la inducción de células CD8+ específicas que causan ambas, destrucción de células de melanoma y pérdida de melanocitos cutáneos (Yee y cols., 2000; Chang y cols., 2011). La activación e incremento de la presentación a las células dendríticas de otros Ags de diferenciación presentes en los melanocitos (no en la formulación vacunal) propiciada por la restauración de la



inmunocompetencia, pudiera producir respuestas de células TCD8+ y/ o respuestas específicas de Acs contra ellos. No obstante, el rol exacto de las células T infiltrantes en la destrucción de los melanocitos no ha sido evaluado completamente. En la práctica, puede estar en relación con la despigmentación que ocurre espontáneamente en el melanoma o después de estrategias de vacunación (Jacobs y cols., 2009), ya que en lesiones de melanoma en regresión y en el vitíligo, se han detectado linfocitos T citotóxicos expandidos clonalmente (Garbelli y cols., 2005).

El análisis de la respuesta antitumoral no fue un objetivo primario en el estudio por tratarse de un diseño de EC Fase Ib/IIa (este estudio no posee control concurrente y el no. de pacientes es limitado), sin embargo, los resultados obtenidos en materia de respuestas objetivas y supervivencia merecen resaltarse. En este EC se encontró un incremento estadísticamente significativo de la mediana de la SV global de los pacientes con melanoma cutáneo avanzado irreseccable y metastásico que mostraron respuesta objetiva al tratamiento vacunal. Esto constituye una evidencia adicional aunque sin validez externa de la acción antitumoral de la vacuna en este grupo de enfermos. Se impone su evaluación en el marco de ensayos clínicos Fase II controlados.

#### *4.3 Conclusiones*

- La formulación vacunal NeuGcGM3/VSSP/MONTANIDE ISA 51 administrada por la vía IM resultó segura. La dosis de 200 µg mostró un perfil de toxicidad más tolerable. No hubo dosis máxima tolerable.
- La vacuna NeuGcGM3/VSSP /MONTANIDE ISA 51 administrada por la vía IM fue inmunogénica con respuestas de Acs anti -NeuGcGM3 de isotipo IgG, IgM e IgA en ambos niveles de dosis.
- El limitado número de pacientes que presentó algún grado de respuesta clínica objetiva incrementó la mediana de supervivencia global.

CAPÍTULO 5. ENSAYO CLÍNICO FASE IB/IIA CON LA FORMULACIÓN VACUNAL  
NeuGcGM3/VSSP ADMINISTRADA POR LA VÍA SUBCUTÁNEA EN PACIENTES CON  
MELANOMA CUTÁNEO AVANZADO

## INTRODUCCIÓN

Estudios pre clínicos realizados en el Departamento de vacunas del CIM, con la formulación NeuGcGM3/VSSP sin el adyuvante Montanide ISA 51 y administrado por la vía subcutánea en ratones C5BL/6 retados con el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis 3Il-122, demostraron que la formulación sin el adyuvante oleoso generó en los animales un efecto antimetastásico similar a la administración IM (Labrada y cols., 2008). Este resultado permitió conocer que el preparado podía ser funcional sin necesidad de emulsificarlo si se administraba por la vía SC, lo que permitiría simplificar los procedimientos, disminuir la toxicidad local y los costos de la vía de inmunización (Fernández y Mesa, 2001). Se hizo necesario investigar esta nueva forma de administración en humanos, con el conocimiento de que el sistema inmune en su complejidad puede ser sensible a los cambios del preparado vacunal en su forma de presentación y vía de administración a pesar de no modificarse el antígeno (NeuGcGM3) y su transportador (VSSP). Por esta razón se propuso la realización de un ensayo clínico Fase Ib/IIa con la formulación sin adyuvante y por la vía de administración SC en pacientes con melanoma metastásico,

Este estudio abierto, multicéntrico, secuencial, no controlado, con escalado de dosis, incluyó 35 pacientes: 27 provenientes del INOR y 8 del HUD Celestino Hernández de Villa Clara, con los criterios de inclusión y exclusión ya señalados, comunes a los dos ensayos clínicos.

La vacuna NeuGcGM3/VSSP se administró a 35 pacientes en 4 niveles de dosis ascendentes consecutivos desde 0.15; 0.3; 0.6 y 0.9 mg. Estos grupos incorporaron 5, 5, 6 y 4 pacientes cada uno. Después se decidió aumentar en 5 más el número de pacientes en el nivel de 0.9 mg e incluir dos niveles de dosis adicionales: 1,2 y 1,5 mg con 4 y 6 sujetos respectivamente con el fin de explorar mejor los niveles más altos de dosis y poder determinar la dosis máxima tolerable.

*Esquema de inmunización*

Los pacientes incluidos recibieron el preparado vacunal después de transcurridas cuatro semanas del último tratamiento oncoespecífico. La inmunoterapia consistió en nueve inmunizaciones; las 5 primeras con frecuencia quincenal y las restantes de forma mensual. Luego de culminada la 9<sup>na</sup> dosis, podían recibir dosis adicionales al esquema planificado, reinmunizándose mensualmente hasta completar el año de tratamiento (15 dosis) (gráfico 2). Aquellos con respuesta objetiva al 6<sup>to</sup> mes (RC, RP, o EE) y los que aún con progresión de la enfermedad presentaron una capacidad funcional igual o menor a 1 recibieron inmunizaciones adicionales. Al igual que en el primer ensayo clínico, no se permitió otro tratamiento oncoespecífico convencional concurrente excepto la cirugía.

### *5.1 Resultados*

Las características generales del grupo de 35 pacientes, de acuerdo a los niveles de dosis estudiados se muestran en la [tabla 6](#). En el ensayo clínico, solo 31 pacientes fueron evaluables inmunológicamente (88.5%) pues recibieron al menos 5 dosis del preparado vacunal, sin embargo, se consideraron todos en la evaluación de la toxicidad y la respuesta antitumoral de acuerdo a la intención de tratar. La distribución por sexo fue similar en los 6 niveles de dosis estudiados. La mediana de la edad para todo el grupo fue de 53 años en un rango de 27 a 79 años. Todos los pacientes presentaron capacidad funcional entre 0 y 1 de acuerdo a las escalas ECOG – OMS en el momento de la inclusión. Al analizar la localización del tumor primario, se encontró que la más frecuente fue “miembros” (16/35) para el 45% de los casos, seguida por “Cabeza y Cuello” y “tronco” con frecuencia para la primera de 8/35 (22,85%) y 7/35 (20%) para la segunda. En 4 pacientes el tumor primario se consideró desconocido por no existir la biopsia previa (Tx). Presentaron metástasis en piel, tejido celular subcutáneo y ganglios (M1a) el 51 % de los pacientes (18/35). En 10 de éstos (28,6%) se trataba de lesiones localmente avanzadas e irresecables. El resto de las metástasis clasificadas como M1a se observaron en

22.8% (8/35) de los enfermos incluidos. El 31.5% de los pacientes presentó metástasis pulmonares. En 9 de estos casos se encontraban asociadas a metástasis en las glándulas suprarrenales o a metástasis a partes blandas. Las primeras se agruparon en el acápite “viscerales” y las segundas se agruparon bajo el acápite pulmón. Las metástasis viscerales reportadas se localizaron en glándulas suprarrenales, peritoneo visceral y en intestino delgado. En el 14,2% de los pacientes las metástasis habían sido completamente resecaadas al momento de la inclusión. Con respecto al tratamiento previo a las inmunizaciones, el 57% de los pacientes sólo recibió tratamiento quirúrgico. En el resto, además de la Cirugía, se administró Bioquimioterapia con IFN (17%) e IFN a altas dosis (17%). Sólo un paciente recibió tratamiento con radiaciones ionizantes antes de su inclusión. El 86 % de los pacientes incluidos presentaban enfermedad progresiva y resultaron uniformemente distribuidos en los 6 niveles de dosis explorados. En cuanto al número de dosis recibidas, el 88,6% recibió más de 5 dosis de la vacuna y el 45.6% recibió más de 10.

### *5.1.1 Seguridad*

Todos los pacientes se incluyeron en este análisis. En total se reportaron 1512 EAs en los 35 pacientes incluidos, todos relacionados con la vacunación y distribuidos en los 6 niveles de dosis (tabla 7); ninguno fue muy grave ni irreversible. El 90 % de ellos se clasificaron según la intensidad como ligeros (grado I), 8 % moderados (grado II) y 2% severos (grado III). A partir de la dosis de 300 µg, los EAs incrementaron en intensidad de ligeros a moderados y aparecieron indistintamente aunque con muy baja frecuencia los de grado III. Los síntomas pseudo gripales, estuvieron presentes en todos los niveles de dosis, y fueron, junto a la toxicidad en el sitio de inmunización los eventos más frecuentemente descritos. Se observaron cambios inflamatorios en adenopatías, lesiones en piel y TCS durante las inmunizaciones en 4 pacientes de la serie en los niveles de 0.3 mg (paciente 5), 0,6 mg (pacientes 11 y 12) y 1,5 mg (paciente 35).

Ocurrieron reacciones de hipersensibilidad en 2 pacientes de los niveles de dosis 0.3 mg (paciente 07) y 0.9 mg (paciente 24) respectivamente y en 2 pacientes del nivel 1,5 mg (pacientes 32 y 34). En todos los casos el proceso fue reversible, de corta duración y sin secuelas. Estos enfermos continuaron recibiendo sus inmunizaciones regularmente con premedicación de Dipirona 600 mg y Difenhidramina 20 mg, ambas por vía oral, sin que se repitiera el evento. La mayor concentración de eventos adversos se observó a partir del nivel de dosis de 0.9 mg; en este nivel se incluyeron más pacientes que en el resto de los grupos. Cuando se analiza el número de EAs por paciente en cada nivel de dosis, es evidente que en el nivel de 0.9 mg es similar al del resto de los niveles, excepto en los de 0.15, 0.3 y 0.6 mg, cuyos valores son netamente inferiores. En general, la toxicidad de leve intensidad predominó en el universo de los pacientes estudiados. No pudo identificarse una toxicidad limitante, pero resultó claro que la toxicidad observada fue más intensa en los pacientes al escalar las dosis. No obstante esto, ninguna manifestación fue muy grave ni irreversible, por lo que consideramos que en términos generales la formulación vacunal fue bien tolerada.

#### *5.1.2 Respuesta inmune*

Veintiocho de 35 pacientes se evaluaron en cuanto a la inmunogenicidad. En los restantes no pudo realizarse el seguimiento inmunológico debido a que no se colectaron muestras de suero. Se observaron títulos pre-inmunización IgM e IgG en 18 de los 28 pacientes (64,3%). El 82% de los 28 pacientes desarrolló anticuerpos de isotipo IgG y/o IgM con la inmunización. Los resultados del inverso de los títulos de estas inmunoglobulinas contra NeuGcGM3/VSSP se muestran de forma global por nivel de dosis en la fig. 7. El rango de respuesta de anticuerpos de isotipo IgM fue de 1/80 a 1/10240, mientras que el de IgG fue de 1/80 a 1/5120. Los títulos máximos de anticuerpos en los pacientes inmunizados con las dosis 0,9; 1,2 y 1,5 mg fueron superiores y decayeron en el 6to mes. Se observó uniformidad en la presencia de títulos contra

IgG e IgM en el nivel de dosis de 0.9 mg. En este estudio no se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgA ni si existió respuesta inmune contra otros gangliósidos como NeuAcGM3 y NeuAcGM2. No se detectaron diferencias entre las diferentes dosis en los títulos de IgM e IgG según el Test de Comparación Múltiple de Duncan ( $p>0.05$ ). Al realizar el análisis de varianza por el test ANOVA de una rama no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.5520$ ) entre todas las dosis estudiadas de la formulación vacunal con respecto a la magnitud de los títulos de IgG ni de IgM ( $p= 0.6277$ ). No se encontró relación entre los títulos de Acs y la respuesta antitumoral ( $p=0.24$ ).

### *5.1.3 Respuesta antitumoral y desarrollo de Vitiligo.*

La [tabla 8](#) muestra la mejor respuesta obtenida tras el tratamiento. Se observó respuesta objetiva en 45 % de los pacientes evaluables y en el 40 % del total de pacientes por la intención a tratar. El paciente 23, con melanoma de alto riesgo, en RC después de la exéresis total de las lesiones metastásicas y sin otro tratamiento adyuvante después de la cirugía, mantiene esa condición 56 meses después. La paciente 32, con melanoma metastásico intestinal, obtiene la RC después de recibir todas las inmunizaciones programadas (15) y se mantiene en esa condición 46 meses después. Una paciente (24) obtuvo RP y la mantuvo 12 meses después de la evaluación final del estudio. Dos pacientes (03) y (07) obtuvieron RP de 29 y 13 meses de duración respectivamente. El primero permanece vivo en esa condición. En nueve pacientes la mejor respuesta objetiva se clasificó como Enfermedad Estable. La tabla 8 también muestra la duración de la respuesta objetiva según los diferentes niveles de dosis. El 50% de estos pacientes presentó más de 13 meses de duración de la respuesta objetiva (7/14); entre ellos 3 pacientes con EE en un rango de duración entre 13 y 80 meses (pacientes 10, 18 y 20), dos de ellos presentaban metástasis pulmonares y suprarrenales bilaterales. Se demostró la presencia de vitiligo en una enferma (07) después de la 8va dosis de inmunización que

posteriormente se generalizó. En esta paciente se documentó una respuesta parcial, de la cual se hablará más detalladamente en el capítulo de reporte de casos. No hubo otros pacientes con vitiligo en este estudio.

#### *5.1.4 Supervivencia de los pacientes inmunizados con NeuGcGM3/VSSP.*

Como se expresó anteriormente en el capítulo 4, no estaba entre los objetivos de este pequeño ensayo Fase Ib /IIa la evaluación de la SV, pero al igual que en el caso de la vacuna administrada por la vía IM, y aún conociendo sus limitaciones, resultaba interesante conocer los resultados en este grupo de pacientes. Se evaluó la relación entre la presencia de respuesta pre inmune IgG, IgM o ambas contra NeuGcGM3 con la SV de los pacientes tratados (Estadígrafo de Log rank). Se dispuso de resultados en 28 de 35 pacientes en cuanto a inmunogenicidad. Se estudió la relación de la presencia o no de títulos de anticuerpos preinmunes IgG, IgM o ambos, superiores a 1/80 con la SV global. En las 2 situaciones existieron diferencias estadísticamente significativas en las medianas para este parámetro respecto a los que no presentaron respuesta preinmune de Acs. Los pacientes con valores de respuesta preinmune de isotipo IgM (n=17) obtuvieron mediana de SV de 35.6 meses en comparación con aquellos que no los presentaron (18.16 meses) (p=0,01) (fig.8). Aquellos que desarrollaron títulos preinmunes de IgG (n=9) obtuvieron mediana 41,9 meses a diferencia de los que no los presentaron (mediana de 19,26 meses) (p=0,01) Al analizar si había relación entre la existencia de respuesta preinmune IgG e IgM (títulos iguales o mayores que 1/80) y la respuesta clínica alcanzada con la vacunación no se obtuvieron diferencias significativas por el estadígrafo  $\chi$  cuadrado (p = 0,396 y p=0,470; respectivamente). Los valores de muestra que cumplían estas consideraciones fueron muy pequeños.

La relación entre la respuesta antitumoral obtenida y la SV global de los pacientes inmunizados se estudió en el total de los pacientes de acuerdo a la intención de tratar. Los pacientes que



obtuvieron respuesta clínica objetiva (RC+RP+EE) (n=14) con las inmunizaciones, obtuvieron una mediana de SV global de 36,33 meses respecto a los progresores (n=21) los cuales alcanzaron una mediana de SV de 18,16 meses (fig. 9). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa (p=0,001). No se demostró diferencia estadísticamente significativa en la SV global de los pacientes en cuanto al sitio metastásico (p=0,21), ni en cuanto a los niveles de dosis (p=0,80). Las tasas de la SV global se muestran en la tabla 9. A los dos años del diagnóstico del estado metastásico, 49 % de los pacientes estaba vivo. Esta cifra se redujo a 29% a los tres años y a 17% a los cinco años.

## *5.2 Discusión.*

Durante años, la investigación básica translacional apoya a la clínica en la búsqueda de mejores opciones para los pacientes aquejados por melanoma (Apostolopoulos y cols. 2008; Kirkwood y cols., 2012). Desafortunadamente, en la actualidad la relativa disminución de la mortalidad observada mundialmente por esta enfermedad se debe primariamente a la aplicación de las estrategias de prevención y diagnóstico precoz y no a los avances terapéuticos (Rigel y cols., 2010; Finn y cols., 2012). Como se expuso con anterioridad, en la enfermedad metastásica los métodos de tratamiento oncoespecíficos clásicos resultan insuficientes al observarse respuestas completas durables en la minoría de los enfermos y los aumentos de la SV global con calidad de vida son raros y poco reproducibles (Garbe y cols., 2011). A pesar de la implementación de múltiples alternativas para favorecer la generación de una respuesta inmune efectiva contra el melanoma, la inmunoterapia no ha resultado suficientemente útil, entre otros factores, por la compleja naturaleza de las interacciones entre el tumor, su microambiente y el sistema inmune del hospedero (Rosemberg, 2004; Kirkwood,2012). La IL-2 constituye el mejor ejemplo: ha mostrado respuestas objetivas entre parciales y completas en el 16% de los pacientes tratados, pero solo duraderas en el 4% de ellos, lo que demuestra la inducción de células de memoria

útiles en los pacientes aunque no en la magnitud necesaria; por otra parte, la toxicidad de este fármaco, de difícil manejo, hace muy limitada su utilización (Atkins y cols., 2000; 2002). La identificación de parámetros predictores de respuesta con este tratamiento, no ha sido precisada aún. Resultarían muy útiles para orientar el tratamiento y hacerlo un tratamiento personalizado de acuerdo a las características de la enfermedad y del paciente. El manejo adecuado de la toxicidad con esta inmunoterapia (Dillman y cols., 2012), permite alcanzar una mediana de supervivencia global de 20% a 5 años lo que constituye el mejor resultado obtenido para esta enfermedad. Otros procedimientos inmunológicos como la inmunoterapia adoptiva con células TIL ha mostrado resultados relevantes nunca antes logrados en cuanto a la respuesta objetiva en melanoma metastásico, pero con reproducibilidad y aplicabilidad escasas fuera de los centros de investigación (Dudley y cols., 2008; Kirkwood y cols., 2012). A pesar de lo prometedor de las nuevas terapéuticas aprobadas como estándares de tratamiento en 2011, sus principales limitantes son la alta e inusual toxicidad (Hodi y cols., 2010; Chapman y cols., 2011) y lo poco abordables desde el punto de vista económico para la mayoría de los pacientes, que sólo pueden accederlas en el marco de ensayos clínicos o en programas de uso extendido financiados por grandes instituciones y casas farmacéuticas (Bronstein y cols., 2011; Tarhini, 2012; Hamid y cols., 2012; Fellner, 2012). Son múltiples las publicaciones de resultados con vacunas terapéuticas en melanoma, sin embargo, son escasos aquellos con durabilidad suficiente como para cambiar las estadísticas de mortalidad en esa enfermedad. En la mayoría sus resultados sólo son “efectos de la vacunación sobre el sistema inmune”, por lo que aún no puede hablarse de efectividad con esta terapéutica (Rosenthal y cols., 2008; Medical Policies, Melanoma Vaccines 2011). No obstante, si bien no siempre claramente demostrable, existe una relación entre la capacidad de las vacunas de estimular una respuesta inmune celular y/o de anticuerpos con las evidencias de respuesta clínica en los pacientes (Rosemberg, 2004; Riley y

cols., 2008). Por esto muchos autores estiman que son necesarios cambios en las estrategias de vacunación que induzcan un incremento en el rendimiento y la actividad de las células CD4+, que contribuyan a eliminar no sólo los tumores, sino los mecanismos inmunosupresores mediados por linfocitos T que los indujeron (Terando y cols., 2007; Berinstein, 2007; Kirkwood y cols., 2012; Mozillo y Ascierto, 2012).

La vacuna NeuGcGM3/VSSP por la vía SC resultó segura en todas las dosis ensayadas. Entre los eventos adversos observados en los pacientes tratados ninguno se clasificó como muy severo o irreversible. Comparativamente con su similar por la vía IM, la toxicidad local si bien estuvo presente en todos los pacientes, fue menos intensa. No se describió abscedación en el sitio de inmunización, lo que puede estar relacionado con la ausencia del Montanide ISA 51 en esta formulación. En general, la inmunoterapia activa específica con vacunas en el melanoma resulta tolerable y segura (con la mayoría de las formulaciones reportadas en la literatura), si se comparan sus efectos con otros tipos de tratamientos (Eggermont y cols., 2009). La vacuna GMK (Livingston y cols., 2001; Kirkwood y cols., 2001), es una vacuna que tiene como antígeno el gangliósido GM2, conjugado con KLH y adyuvado con QS21. Esta vacuna presentó toxicidad local y de tipo sistémico (síntomas seudogripales) con intensidad y duración de 2 a 5 días muy similar a nuestros resultados pero sin reportes de vitiligo. Las vacunas de células dendríticas con péptidos o antígenos de melanoma administradas concurrentemente con Il-2 mostraron igualmente gran similitud en cuanto a los eventos adversos locales y sistémicos, además del desarrollo del vitiligo (Ray y cols., 2009; Ridolfi y cols., 2010). Las vacunas autólogas tampoco muestran perfiles de toxicidad diferentes a los observados con NeuGcGM3/VSSP (Wallack y cols., 1998; Morton y cols., 2007). Las vacunas de péptidos, proteínas de estrés térmico (del inglés: *heat shock proteins*) y las de células completas o lisadas no difieren en toxicidad a las anteriores (Wallack y cols., 1998; Hersey y cols., 2002

Testori y cols., 2008). NeuGcGM3/VSSP es una vacuna molecular con un antígeno purificado, tiene la ventaja de su reproducibilidad y seguridad en cuanto a manipulaciones biológicas, y es capaz de movilizar el sistema inmune innato, para generar respuestas contra el gangliósido NeuGcGM3, resultado que se observa en este estudio.

Entre otras variantes de tratamiento, la Quimioterapia, específicamente el DTIC como monoterapia, si bien con toxicidad fundamentalmente hematológica y reversible, produce resultados clínicos que han sido caracterizados últimamente como de tipo "placebo" por los bajos porcentajes de respuestas objetivas obtenidas (menos del 10%) (Lee y cols., 2012). Es considerado un tratamiento paliativo en el melanoma metastásico (Schadendorf y cols., 2006; Middleton y cols., 2007; Lee y cols., 2012). Su homólogo oral, la Temozolomida, no difiere mucho en actividad antitumoral, aunque tiene la ventaja de su administración oral, pero resulta mucho más costoso (Middleton y cols., 2000). El DTIC es utilizado como patrón de comparación en los ensayos clínicos con nuevos agentes en melanoma (Avril y cols., 2004; Schadendorf y cols., 2006; Middleton y cols., 2007; Atkins y cols., 2008; Robert y cols., 2011; Chapman y cols., 2012). La Poliquimioterapia produce variadas manifestaciones de toxicidad y su uso no se justifica actualmente de forma rutinaria en el escenario metastásico, sólo en aquellos pacientes muy sintomáticos en los que se desee lograr respuestas paliativas (NCCN Guidelines versión 3. 2012 Melanoma). Una excepción a esta situación existe en los melanomas originados en mucosas, relativamente insensibles a la inmunoterapia y donde algunos resultados actuales en adyuvancia después de la cirugía reportan mayor SV global y libre de progresión (Lian y cols., 2012). No existen segundas líneas de tratamiento útiles con quimioterapia en el caso del melanoma. En cuanto a la Bioquimioterapia, la mayoría de los regímenes incluyen fármacos antineoplásicos de reconocida actividad en el melanoma como las sales de platino, la vinblastina y el DTIC, unidos a la IL-2 y/o al Interferón, combinaciones que en muchas ocasiones requieren hospitalización y

cuidados especiales por la toxicidad que producen, en un espectro que incluye la toxicidad hematológica, renal, neurológica y neuropsiquiátrica como manifestaciones principales. Los intentos de disminuir los índices de toxicidad de estos tratamientos han traído como consecuencia la disminución del número de las respuestas objetivas y de la duración de las mismas (Buzaid y cols., 2001; Ives y cols., 2007; Atkins y cols., 2008). El Ipilimumab, (inhibidor del bloqueo de la función de las células T activadas) y Vemurafenib (inhibidor de la mutación v600e del gen BRAF) etc, si bien impresionan en cuanto a la magnitud de las respuestas que producen en el escenario de la enfermedad avanzada, presentan una amplia gama de manifestaciones de toxicidad que van desde la aparición de Carcinomas Epidermoides y Queratoacantomas, la fotosensibilidad extrema, hasta manifestaciones variadas de autoinmunidad que motivan la interrupción del tratamiento y pueden causar la muerte en individuos con capacidad funcional limitada (Hamid y cols., 2012; Chapman y cols., 2012). Comparativamente, fue evidente la seguridad demostrada por NeuGcGM3/VSSP en este estudio.

El producto resultó inmunogénico en todos los niveles de dosis administrados, sin embargo, su inmunogenicidad celular no se pudo evaluar. Más del 80% de los pacientes desarrolló títulos IgG o IgM. Por su naturaleza de autoantígenos timo-independientes, los gangliósidos suelen desencadenar la respuesta inmune humoral con bajos títulos de anticuerpos de corta duración y predominantemente de isotipo IgM, y sólo en pocos casos de isotipo IgG, aún cuando se realicen inmunizaciones repetidas. En este caso se obtuvieron títulos apreciables de IgG y de IgM, estos últimos, de conocida presentación polimérica; esto sustenta lo planteado en los estudios preclínicos acerca del secuestro por estos anticuerpos de los gangliósidos circulantes y del microambiente tumoral, acción que provoca la disminución del estado de inmunosupresión a través de una cadena de eventos celulares y moleculares que traen como consecuencia la inmunorestauración observada en los pacientes inmunizados, lo que contribuye indirectamente al

enlentecimiento de la progresión tumoral (Ravindranath y cols., 2007). Los mayores valores de IgG se desarrollaron en los pacientes tratados con 900 µg y los mayores de IgM en los 3 niveles de dosis superiores. Otros preparados vacunales contra gangliósidos producen respuestas de anticuerpos de tipo IgM, e IgG tales como GD2 lactona -KLH-QS21 pero los títulos observados en nuestra serie fueron más elevados (Livingston y cols., 1994, 1995 y 1997; Kirkwood y cols., 2001; Ragupathi y cols., 2003). La duración de la respuesta de anticuerpos (6 meses) fue similar para ambos preparados vacunales. El valor máximo de los títulos obtenidos con la administración SC no superó a los obtenidos con la administración IM, donde el uso de un adyuvante pudiera ser el responsable de una respuesta de anticuerpos de mayor magnitud. NeuGcGM3/VSSP por su naturaleza de estimulador del sistema inmune innato y su pequeño tamaño (nanopartícula de aproximadamente 20 nm), permite su incorporación a las células dendríticas, en las cuales estimula la diferenciación a través del reconocimiento de las señales de peligro producidas por el CPME de la *Neisseria meningitidis* por los Toll Like Receptors (Labrada y cols., 2010). KLH, proteína de gran tamaño usada por Livingston como transportador si bien generó respuesta de anticuerpos, carecía de estas señales de peligro que son necesarias para la activación del sistema inmune (Livingston y cols., 1997, Estévez y cols., 2000). Nakarai y cols., plantearon la posibilidad del uso de la forma Nglicolilada de antígenos como blancos terapéuticos para el melanoma al describir títulos preinmunes IgG e IgM para el antígeno Hanganitzu-Deicher (medido como glicoproteína) en los pacientes con melanoma en estadio II. Estos presentaron mayores tiempos de SV libre de enfermedad a 5 años en comparación con aquellos que no los desarrollaron y que presentaron recaídas a los 2 años (Nakarai y cols., 1990). En este estudio, este parámetro no se evaluó por tratarse de pacientes con melanoma metastásico ya en progresión. Sin embargo, el análisis de la mediana de SV global del subgrupo de pacientes con títulos de anticuerpos pre inmunes IgG, IgM o ambos contra NeuGcGM3 mostró resultados

superiores de SV global respecto a lo publicado en la literatura para diferentes series de pacientes con melanoma metastásico (Spagnolo y Queirolo, 2012) .

Con respecto a la respuesta objetiva antitumoral, se observó en todos los niveles de dosis si incluimos la estabilización tumoral. Particularmente se observaron 6 respuestas objetivas en el nivel de dosis de 0.9 mg . Estos resultados estuvieron vinculados a un incremento de la mediana de supervivencia global independiente del nivel de dosis y del sitio metastásico.

Resulta necesario el cambio del paradigma terapéutico hacia el representado por las terapias biológicas, ya que el tiempo requerido para propiciar una respuesta inmunológica celular efectiva en pacientes con neoplasias avanzadas generalmente excede al programado habitualmente en las investigaciones (Lage y Crombet, 2011, Schlom, 2012 ) . Muchos pacientes son excluidos al detectarse progresión de la enfermedad según los criterios clásicos de respuesta antitumoral; de esta manera se pierde la probabilidad de observar el efecto biológico tardío producido por la inmunoterapia (Hoss y cols., 2007, 2011). De aquí que los actuales sistemas de evaluación de la respuesta antitumoral tienen en cuenta que las respuestas obtenidas con productos biológicos requieren tiempo para el desarrollo de una cascada de eventos celulares y moleculares que terminan en la respuesta objetiva, a diferencia de los resultados con los fármacos citotóxicos convencionales cuyas respuestas ocurren en corto tiempo ( Lothar y cols., 2007; Hoss y cols., 2011). (Gráfico 3 )

Los resultados de SV en los pacientes con melanoma cutáneo avanzado que presentaron respuesta objetiva al tratamiento vacunal pudieran interpretarse como beneficios derivados de la vacunación. Sin embargo, esto no es posible afirmarlo completamente debido a que la muestra disponible es muy limitada y carece de grupo control concurrente por tratarse de un ensayo Fase Ib/IIa con objetivos bien definidos en cuanto a inmunogenicidad , seguridad y evidencias preliminares de respuesta antitumoral. Sin embargo, los mecanismos de acción antitumoral

demostrados en los estudios preclínicos para NeuGcGM3 ya enunciados en otros capítulos, son argumentos que pueden justificarlos.

Con esta formulación vacunal aplicada en pacientes con melanoma cutáneo metastásico fue difícil establecer una dosis óptima biológica. Asimismo, no se demostró dosis máxima tolerable. Se decidió proponer para el ensayo clínico fase II, la dosis de 0.9 mg. Esta elección se sustentó entre otros aspectos en la uniformidad en la respuesta de los títulos de Acs obtenidos, la toxicidad moderada y reversible, además de ser el nivel donde se encontró mayor tasa de respuestas objetivas en los pacientes incluidos.

La administración SC de la vacuna en este ensayo clínico produjo tasas de respuesta objetiva antitumoral similares a las obtenidas con la administración IM y esta formulación no adyuvada de NeuGcGM3/VSSP por la vía SC fue más simple de administrar y más económica comparada con la administración intramuscular (IM) con Montanide ISA 51 (Fernández y Mesa, 2001 )

Los resultados obtenidos sustentan la realización del EC Fase II controlado en pacientes con melanoma avanzado y metastásico.

### *5.3 Conclusiones:*

- NeuGcGM3/VSSP aplicada por vía subcutánea fue segura en todos los niveles de dosis estudiados. No se demostró una dosis máxima tolerable en este estudio.
- La formulación vacunal NGcGM3/VSSP aplicada por vía subcutánea resultó inmunogénica en los 6 niveles de dosis .
- El subgrupo de pacientes inmunizados con la formulación vacunal NGcGM3/VSSP administrada por vía subcutánea que obtuvieron algún grado de respuesta objetiva, presentaron ventajas en la SV global.



CAPITULO 6. EVIDENCIAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN PACIENTES  
CON MELANOMA CUTÁNEO INMUNIZADOS CON NeuGcGM3/VSSP. REPORTES DE  
CASOS.

## INTRODUCCIÓN:

La ejecución de los 2 ensayos clínicos Fase Ib/IIa con el preparado vacunal NeuGcGM3 / VSSP presentados con anterioridad en este trabajo, proporcionó en primer lugar, *evidencias de la expresión del antígeno NeuGcGM3 en los tumores primarios y en las metástasis ganglionares* de los pacientes con melanoma estudiados. En segundo lugar evidenció la *seguridad e inmunogenicidad* de la formulación, con lo cual se confirmó *la prueba de principio* que identifica la primera fase en desarrollo clínico de una vacuna (Hoos y cols., 2011). En tercer lugar, *las respuestas clínicas* observadas en los pacientes tratados constituyen evidencias de actividad antitumoral que resultan útiles para complementar y avalar la posición del gangliósido NeuGcGM3 como blanco terapéutico en esta enfermedad a pesar de las controversias existentes sobre el tema. Adicionalmente, los resultados obtenidos en materia de SV, si bien anecdóticos de acuerdo al diseño y los objetivos de estos ensayos Fase Ib/IIa, son inusuales en pacientes con melanoma cutáneo avanzado, donde la mediana de SV reportada en la mayoría de las series no sobrepasa los 12 meses (Lee y cols, 2000; Agarwala y cols., 2009b, Ascierto y cols., 2011). A continuación presentaremos los resultados más importantes de este análisis.

6.1 Evidencias de respuesta clínica relacionadas con aumentos de la SV global en pacientes inmunizados con NeuGcM3 /VSSP por ambas vías de administración (IM+SC).

### **6.1.1 Supervivencia global en relación con la respuesta clínica y la presencia de títulos pre- inmunes de Inmunoglobulinas IgG o IgM.**

Este análisis por intención a tratar se realizó con las mediciones de los pacientes con melanoma cutáneo avanzado y metastásico que recibieron la formulación vacunal por cualquiera de las vías de administración e independientemente del nivel y el número de dosis recibidas. La

evaluación de la presencia de respuesta pre inmune de anticuerpos de isotipo IgM e IgG con títulos mayores e iguales que 1/80 con la obtención de respuesta clínica a través de la

vacunación no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,479$ ) y ( $p=0,396$ ) ( $\chi$  cuadrado). Sin embargo, en aquellos pacientes donde se observó respuesta preinmune IgM ( $n=21$ ), la mediana de SV fue de 33,97 meses en comparación con aquellos que no la presentaron (20,8 meses) ( $n=24$ ) (figura 10). En cuanto a los valores de IgG preinmune ( $n=12$ ) se obtuvo una mayor mediana de SV global (35,6 meses) respecto a aquellos que no la presentaron ( $n=34$ ) (mediana de 20,8 meses). Estas diferencias no tuvieron significación estadística para estos dos isotipos de inmunoglobulinas ( $p=0,16$  y  $p=0,24$  respectivamente según estadígrafo Log rank). No obstante lo anterior, puede señalarse un beneficio clínico, ya que los pacientes con este tipo de respuesta alcanzaron más de un año de SV respecto a los que no la presentaron.

### **6.1.2 Supervivencia Global en pacientes que alcanzaron respuesta clínica**

El alcanzar algún grado de respuesta clínica (RC+RP+EE) representó una ventaja de SV para los pacientes inmunizados con la vacuna por cualquiera de las vías de administración e independiente de la dosis recibida. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre la mediana de SV para los pacientes con respuesta clínica objetiva ( $n=19$ ) con 38,83 meses y la alcanzada por los progresores con 14,03 meses ( $n=34$ ) ( $p=0,00$  estadígrafo Log Rank) (fig. 11).

### **6.1.3 Supervivencia Global en pacientes con respuesta pre inmune de Acs IgG y/o IgM con respuesta clínica objetiva.**

Los pacientes del estudio que presentaron títulos pre inmunes de anticuerpos anti-NeuGcGM3 de isotipo IgG y/o IgM con títulos mayores o iguales que 1/80 y alcanzaron algún grado de

respuesta clínica (n=10) tuvieron una mediana de SV mayor que los progresores (n=13) (44,93 vs 14,5 meses). Esta diferencia tuvo significación estadística (p=0,001; estadígrafo Log Rank)

con un beneficio clínico de más de 30 meses de SV a favor de los pacientes respondedores con títulos preinmunes de IgG o IgM (fig.12).

#### **6.1.4 Supervivencia Global en pacientes con respuesta inmune IgG y respuesta clínica objetiva.**

Los pacientes que presentaron respuesta inmune IgG con títulos mayores o iguales que 1/80 y respuesta clínica objetiva no presentaron diferencias estadísticamente significativas con aquellos que no respondieron (p= 0,153; estadígrafo Log rank). La mediana de SV global de los que tuvieron respuesta clínica (n=6) fue de 38,83 meses y la de los progresores (n=6) 11,87 meses. A pesar de tener pocos pacientes que cumplen esta condición, el valor tiene relevancia clínica pues los pacientes respondedores vivieron más de 2 años respecto a los progresores.

#### **6.1.5 Supervivencia Global de los pacientes que presentaron respuesta IgM mayor que 1/80 y respuesta clínica.**

En los pacientes que desarrollaron títulos de IgM mayores que 1/80 y presentaron algún grado de respuesta clínica objetiva, se demostró una diferencia estadísticamente significativa (p=0,000; estadígrafo Log Rank) entre la mediana de SV de los respondedores 33,96 meses (n=10) respecto a los progresores (20,83 meses) (n=12). La relevancia clínica viene dada por la diferencia de más de un año de SV a favor de los respondedores.

A continuación, se expone el reporte clínico de algunos casos seleccionados del universo de pacientes de ambos EC en los cuales la evolución clínica manifiesta la presencia de respuesta antitumoral.

## 6,2 Reportes de casos clínicos

### **Reporte de caso número 1**

Paciente SAB de 79 años, femenina, de piel blanca, con diagnóstico de melanoma acral lentiginoso del tercer dedo del miembro inferior izquierdo, operada por amputación de la falange distal el 12 de octubre del 2000. Estadificada como T1aN0M0. Estadio Ia. El tumor primario se informó como : *Melanoma Maligno pigmentado a predominio de células fusiformes, invasor hasta el dermis papilar, ( nivel I de Clark, 0,3 mm Breslow, subtipo lentigo acral subungueal, con respuesta hospedero tumoral poco activa, no ulcerado, completamente extirpado. (Biopsia 00-09284 INOR)*. Tuvo buena evolución clínica hasta julio del 2004 en que se detectaron adenopatías inguinales homolaterales. Se realizó un vaciamiento inguinopélvico y el reporte de anatomía patológica informó *metástasis en 5 ganglios pélvicos de 11 examinados 1 de ellos con necrosis (Biopsia: 04-07596 INOR)*. Dadas las condiciones generales de la enferma, no recibió tratamiento adyuvante y se incluyó en el ensayo clínico Fase Ib/IIa con el preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP por vía SC en el nivel de dosis de 0.3 mg (11 de Noviembre 2004). En ese momento no existían metástasis demostrables. En mayo del 2005, se detecta progresión de la enfermedad a nivel pulmonar, con nódulos metastásicos en ambos campos pulmonares de 8 mm y masa pre aórtica derecha de 28 mm, ambos en su diámetro mayor. El programa de inmunizaciones continuó sin interrupción, en tanto que la paciente permanecía

asintomática. La toxicidad en su caso se limitó a síntomas pseudo gripales, (fiebre grado I y mialgia grado II). En agosto del 2005 aparecen algunas áreas de despigmentación cutánea, y varios meses más tarde, vitiligo clínicamente establecido (fig.13). Una TAC helicoidal, realizada un año después, (mayo, 2006) reveló una sustancial disminución de las áreas de metástasis consistentes con una remisión parcial del 37% (fig. 14). Mantuvo la respuesta antitumoral obtenida y buen estado general (PS: 1) por espacio de 13 meses durante los cuales continuó las reinmunizaciones. Las lesiones pulmonares reaparecieron (junio 2007) con evolución rápida hasta la muerte en cuadro de insuficiencia respiratoria (Octubre 2007). Recibió un total de 18 dosis de la vacuna y acumuló una SV de 35 meses desde su inclusión en el estudio.

### **Reporte de caso número 2**

Paciente RRC de 58 años de edad, con diagnóstico clínico de Melanoma Maligno cutáneo del calcáneo izquierdo el 21/8/01. Operado en Septiembre 11 del mismo año. El reporte de Anatomía Patológica informó: *Melanoma Maligno pigmentado de células epitelioides y fusiformes en 2 lesiones contiguas ulceradas ambas, de 3 y 1.2 cm respectivamente. Invasor hasta el dermis reticular en la de mayor Nivel (IV) y hasta la unión papilo- reticular la menor, (Nivel de Clark III) Breslow 1.5 mm con infiltrado inflamatorio discreto y bordes de sección quirúrgica libres de tumor. (Biopsia: B20018446 INOR)* Se clasificó como T2bN1M0 etapa IIb y recibió tratamiento con Interferón a altas dosis, según esquema de Kirkwood, que concluyó en Diciembre del 2002. Se mantuvo libre de enfermedad hasta mayo del 2004 cuando presentó una recaída regional con adenopatías poplíteas. Se le realizó vaciamiento ganglionar poplíteo y posteriormente, en abril del 2005 vaciamiento inguinopélvico izquierdo, encontrándose adenopatías positivas para melanoma metastásico en todas estas regiones ganglionares. (Biopsia B-053043 INOR). Se incluyó en el estudio Fase Ib/IIa del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP por la vía SC el 1/7/05 en el nivel de dosis de 0.9 mg. Recibió el tratamiento

completo (15 administraciones) con una toxicidad ligera, evidenciada sólo por dolor leve en el sitio de inyección y de corta duración (grado I), eritema local (Grado I); astenia ligera (grado I) y mialgias (grado I). Evolutivamente, en la TAC evaluativa del 3er mes de iniciado el tratamiento se detectó una imagen quística de la suprarrenal derecha de aproximadamente 3 cm sin otras alteraciones. Un estudio similar, realizado en marzo del año 2006 mostró metástasis pulmonares en LSD de de 17.3 mm y otro de 18.3 mm en la base pulmonar izquierda sin cambios adicionales en los órganos del abdomen. Estas lesiones se mantienen estables durante las evaluaciones subsiguientes hasta la actualidad (fig.15). Para la fecha de este reporte, el paciente se mantiene asintomático, hace vida normal y realiza labores agrícolas (PS: 0). Continúa con re- inmunizaciones mensuales. Acumula una SV de 80 meses desde su inclusión.

### **Reporte de caso número 3**

Paciente ELLT femenina, blanca, de 32 años, con antecedentes de la exéresis de un nevus en la espalda (2006) al que no se realizó biopsia. Un año después, su estado general se deterioró sensiblemente; presentó vómitos frecuentes, sangramiento digestivo alto importante y tumor abdominal palpable. Todo lo anterior motivó una laparotomía de urgencia, que detectó una masa intraluminal en el yeyuno con invaginación del mismo a ese nivel (agosto 2007). Se realizó una resección de 60 cm del mismo con anastomosis término-terminal. En el acto operatorio se describieron además adenopatías mesentéricas de aspecto metastásico. La biopsia de la pieza quirúrgica informó: *metástasis de melanoma maligno amelanico de células epitelioides y globoides. IHQ compatible con melanoma.: S100 (+), Vimentina (+++) HMB45 (+/-). C-kit (-) CK (-). (Biopsia: 0803991 INOR.)* Se estadificó: Tx N3 M1 estadio IV. En la TAC realizada la paciente al momento de su inscripción en el INOR se informó la presencia de un conglomerado de ganglios preaórticos y paravertebrales asociado a un grupo de asas

intestinales dilatadas en mesogastrio con líquido en su interior y ligera uretero- hidronefrosis bilateral rastreada hasta la zona donde se apelotonaban las asas intestinales (TAC 21/3/08)(fig 16). Se incluyó en el EC Fase Ib-IIa de la vacuna NeuGcGM3 /VSSP por la vía SC en el nivel de dosis de 1.5 mg (16/5/08). Como eventos adversos presentó eritema y dolor en el sitio de inyección de corta duración, grado I durante todas las inmunizaciones y un cuadro clínico compatible con reacción de hipersensibilidad al momento de la quinta dosis que no causó la interrupción del tratamiento subsiguiente. Esta paciente continúa sus inmunizaciones hasta hoy, asintomática, con PS: 0 y sin evidencias de progresión tumoral (fig. 16). Tiene una SV acumulada desde la inclusión en el estudio de 46 meses.

#### **Reporte de caso número 4**

Paciente CMM, femenina blanca, con antecedentes de exéresis en 1974 de lesión pigmentada de la cara posterior de la pierna izquierda, que resultó un *Melanoma pigmentado*. (*Biopsia 74-4366 INOR*). No recibió tratamiento adyuvante. En 1988 aparecen lesiones satélites que se trataron exitosamente con BCG administrado en escarificaciones. Esta paciente se mantuvo asintomática hasta el año 2006 en que notó aumento de volumen del muslo y el abdomen. En un TAC realizado se informó la presencia de una masa tumoral a nivel del psoas izquierdo, de 80 mm de diámetro mayor (TAC 24/4/07) Fig 17(a). Recibió en esta ocasión 3 ciclos de quimioterapia con DTIC y carboplatino, asociado a interferón a bajas dosis. Este tratamiento fue imposible de completar por la toxicidad hematológica que causó. En la evaluación de la respuesta antitumoral se observó una ligera reducción del volumen tumoral (70 mm) que clasificó como EE (reducción del 25 %) (TAC 30/7/07) fig. 17(b). En estas condiciones, se incluyó en el estudio Fase Ib-IIa de la vacuna NeuGcGM3 /VSSP por la vía SC en el nivel de dosis de 0.9 mg. (13/8/07). Recibió 26 dosis con manifestaciones de toxicidad consistentes con ligeros síntomas locales (ambos grado I) y síntomas gripales de corta duración (grado I). Al año de



tratamiento, la lesión blanco en la pelvis se había reducido en 50% de su volumen original, TAC (10/7/08) fig.17(c), evaluándose la respuesta al tratamiento como Respuesta Parcial. Se mantuvo en esta condición y asintomática hasta julio 2009 cuando comenzó a referir molestias en la pierna izquierda y región inguinal homolateral, con edema asociado de todo ese miembro. Se comprobó por TAC (21/7/09) el aumento de la lesión reportada anteriormente. La paciente continuó inmunizándose aun en progresión de la enfermedad y falleció en abril del 2011. Acumuló una SV de 43 meses.

#### 6.2.1 Reportes de Vitíligo y despigmentación.

##### **Caso número 1**

Paciente NLA de 49 años, con antecedentes de salud, y diagnóstico de melanoma maligno tipo lentigo acral, subungueal del primer artejo de la mano izquierda con metástasis en tránsito homolaterales, operado fuera del INOR. Se realizó una resección amplia de todas las lesiones subcutáneas con injerto de piel del muslo izquierdo. Se estadificó Tx N3M1 estadio IV después de los estudios de extensión. El Rx de tórax y una TAC no contrastada informaron metástasis en ambos campos pulmonares asociadas a engrosamiento hilar derecho de etiología ganglionar e imágenes areolares sugestivas de dilataciones bronquiales. Al momento de la inclusión, el paciente se encontraba en progresión de la enfermedad, con adenopatía epitrocLEAR izquierda de 3 cm, y un nódulo de 5 cm en la cara anterior del antebrazo de ese lado. Inició el tratamiento el 8 de noviembre del 2000 con 0.2 mg del preparado vacunal NeuGcGM3/VSSP/Montanide ISA 51. Al momento de la 6ª dosis (1/03/01) el paciente estaba en franca progresión de la enfermedad, con la aparición de nódulos de color negro de 2.5 cm, en el área del miembro superior donde se tomó la piel para el injerto cutáneo realizado en el muslo izquierdo, tercio inferior del hemicuello izquierdo, brazo izquierdo (4 cm), espalda y axila izquierda. Al mismo tiempo, se detectaron áreas de despigmentación cutánea (vitíligo) en la mejilla izquierda y

el mentón. Progresivamente en el curso de unos meses, estas áreas de despigmentación se extendieron a las zonas del injerto y eran visibles en forma de halo de despigmentación en las lesiones que presentaban signos de regresión en la piel del tórax y en la axila izquierda. En Agosto del 2001, (inmunización número 13) la mayoría de las lesiones subcutáneas habían desaparecido, así como las pulmonares. Se mantenían solamente 2 pequeños nódulos con sus correspondientes halos de despigmentación en un área del miembro superior izquierdo. Estos nódulos fueron extirpados y el reporte de Anatomía Patológica informó: *tumor compatible con melanoma maligno pigmentado de células fusiformes que infiltra el tejido adiposo y musculo esquelético con necrosis tumoral asociada (24 enero del 2001)*. Después de esto no aparecieron nuevas lesiones. El vitíligo era ya visible en el tronco, la cara y en el área del injerto cutáneo del miembro superior izquierdo (fig.3 y fig. 18). Recibió un total de 17 dosis de la vacuna. El paciente continuó asintomático hasta abril del año 2002, en que se detectaron metástasis hepáticas con rápida progresión que causan su muerte. La SV acumulada desde el inicio del tratamiento fue de 23 meses.

### **Caso número 2**

Paciente JBA masculino, de 69 años, mestizo, con melanoma lentigo acral del 3er dedo del pie izquierdo, amputado en 1995 sin tratamiento adyuvante. En 1997, aparecieron nódulos en tránsito y subcutáneos múltiples en el pie y pierna así como adenopatías inguinales izquierdas. Se le realizó exéresis de las lesiones y vaciamiento inguinopélvico izquierdo con el siguiente informe AP: *metástasis de melanoma maligno en piel y TCS. Metástasis de melanoma maligno en 2 de 6 ganglios inguinales examinados (Biopsia: 97-659799 INOR)*. La inmunotinción con el AcM 14F 7 mostró intenso marcaje en la membrana celular en las metástasis cutáneas en tránsito (fig. 19). La progresión tumoral en el pie decide su amputación parcial. Incluido el 27 de mayo del 2001 en el estudio Fase Ib- Ila de la vacuna NeuGcGM3/VSSP/ Montanide ISA 51 por

la vía IM en el nivel de 0.2 mg. Recibió 16 dosis y todo el tiempo de tratamiento se mantuvo en estado de progresión de la enfermedad. Se observaron halos de despigmentación en algunos de los nódulos tumorales de la pierna (15/4/02) (fig.20). No obstante, la progresión tumoral local se mantuvo, y fue necesario realizar la amputación del MII por razones sanitarias. El paciente no continuó las inmunizaciones después de su operación. Meses después, presentó sangramiento digestivo alto de carácter grave que puso en peligro su vida. Se detectaron metástasis en el intestino delgado, pero no pudo confirmarse histológicamente. Por su precario estado y negativa familiar no fue operado. Recibió tratamiento de soporte únicamente hasta su recuperación. Paralelamente a estos hechos, apareció vitiligo en la cara, tórax y miembros superiores que se extendió hasta la casi totalidad de la superficie cutánea (fig. 21). Actualmente se encuentra vivo, libre de enfermedad, con una SV acumulada de 130 meses.

### *6.3 Discusión.*

El incremento de la SV global con buena capacidad funcional y el control efectivo del crecimiento tumoral, alcanzados con el nivel más bajo de toxicidad es la meta principal a lograr en los pacientes con cáncer. Este hecho, referido al Melanoma, resulta particularmente relevante en el escenario de la enfermedad diseminada, con limitadas opciones terapéuticas (Spagnolo y Queirolo, 2012). Según este nuevo concepto, los nuevos tratamientos podrían ofrecer la posibilidad de transformar la enfermedad en una dolencia crónica, con la que se pueda vivir en equilibrio (Lage y Crombet, 2011; Schlom, 2012). Algunos de los casos presentados en estos reportes ilustran esa situación clínica. Se pudo observar como la re- inmunización en pacientes con buena capacidad funcional en ausencia de respuesta objetiva y aún en progresión tumoral permitió el tiempo necesario para lograr posteriormente la respuesta antitumoral. Otro aspecto interesante en los casos presentados es la aparición de respuesta clínica después de una cirugía sanitaria antecedida por un largo período de tratamiento con NeuGcGM3/ VSSP.

Estos pacientes habían recibido más de 15 inmunizaciones previas al acto quirúrgico. Como se explicó en capítulos anteriores, la reducción del tumor moviliza células tumorales y libera gangliósidos, contra los cuales se desarrolla una respuesta de anticuerpos específicos responsables del inicio de eventos que terminan en la disminución del estado de inmunosupresión y el restablecimiento de la respuesta inmune (Wilgenhof y cols., 2011; Ravindranath y cols., 2002; 2007). La respuesta antitumoral generada en consecuencia a estos eventos inmunológicos se manifiesta con el enlentecimiento de la progresión tumoral y por tanto el estado de “cronicidad” antes mencionado. De esta manera la reducción del volumen tumoral por medio de las metastasectomías, se reafirma como primer planteamiento en los pacientes con melanoma oligometastásico (Faries y Morton, 2006; NCCN Guidelines Melanoma versión 3.2012). En el estudio Fase III de la vacuna Canvaxin + BCG comparada con el BCG solamente, donde se obtuvieron resultados negativos para la vacuna, las metastasectomías realizadas a los pacientes jugaron un papel esencial en el aumento de la SV observado para ambos grupos de tratamiento (Morton y cols., 2007). Los mecanismos de la respuesta inmune necesitan tiempo para establecerse; por esta razón, los pacientes con enfermedad avanzada de progresión rápida, expectativas de vida corta y poca capacidad funcional (PS) asociadas a la inmunodeficiencia inherente a la neoplasia diseminada, no alcanzan a lograr una respuesta inmunológica efectiva. Las tendencias actuales en la inmunoterapia activa específica del melanoma metastásico, están dirigidas a la combinación con los métodos terapéuticos oncoespecíficos tradicionales, es decir, la cirugía, radioterapia, quimioterapia, además de las combinaciones de inmunoterapias etc. Esto tiene la finalidad de reducir el volumen tumoral, y con ello la reducción de todos los elementos de inmunosupresión, entre ellos: disminución de células T regs., las células mieloides supresoras, la inhibición de PD-1 etc., para lograr la activación y potenciación del sistema inmune por medio del cambio de patrón inmune de Th2 a

Th1 (Marshall y cols., 2006). La presencia de Vitíligo en los pacientes tratados es otra evidencia relacionada con la restauración de la inmunidad a través de la inmunoterapia del melanoma, ya que probablemente representa la presencia de respuesta activa de linfocitos T específicos contra antígenos propios en los melanocitos normales de la piel (aunque no pudo medirse). Se ha descrito el vitíligo asociado a este tipo de respuesta de linfocitos T (Yee y cols., 2000; Lengagne y cols., 2004; Garbelli y cols., 2005) como fenómeno autoinmune. Apareció en nuestra serie en individuos sin antecedentes durante el período de tratamiento y no cesó aún después de haberse interrumpido éste. Además, se encontró asociado a diferentes grados de respuesta antitumoral. El vitíligo se considera un factor pronóstico favorable independiente en el melanoma avanzado y metastásico (Gogas y cols., 2006). Un estudio que analizó la presencia de vitíligo en 2954 pacientes de melanoma avanzado y metastásico tratados en una institución italiana, lo encontró presente en el 2,8 % de éstos y con los mejores resultados en cuanto al tiempo para el desarrollo de metástasis a distancia y supervivencia global, de manera tal que su presencia identifica un pronóstico más favorable (Qualino y cols., 2010). La formulación vacunal utilizada en este estudio no contiene antígenos presentes en los melanocitos. La vacuna pudo propiciar “inmunorestauración” en el microambiente tumoral que permitiera la aparición de respuesta inmune contra otros antígenos presentes en los melanocitos normales. En el ensayo por vía IM, tres de los cuatro pacientes que presentaron vitíligo durante las inmunizaciones alcanzaron supervivencias prolongadas. En este estudio, el 82% (29/35) de los pacientes que recibieron la vacuna por la vía SC presentaron respuestas de Acs de uno u otro isotipo y el 64% (14/22) de aquellos que la recibieron por la vía IM. La respuesta IgM contra NeuGcGM3 fue la más frecuentemente observada, todo lo cual, según Ravindranath, se asocia a la probabilidad de obtener respuesta clínica (Ravindranath y cols., 2007). Los anticuerpos de isotipo IgM tienen la característica de ser pentavalentes y por esta razón “secuestradores de antígenos” por

excelencia. Los resultados mostrados representan un argumento más a favor de la utilización de la inmunoterapia activa específica con la formulación molecular NeuGcGM3 / VSSP en pacientes con melanoma. La mediana de SV global del subgrupo de pacientes con respuesta clínica, tratados con esta formulación fueron superiores a los valores de SV que generalmente se describen en la literatura médica para los pacientes con melanoma de acuerdo al sitio de las metástasis (Lee y cols., 2010). Estos resultados, si bien no extrapolables de acuerdo a las características de los EC realizados, sirven de base para proponer la continuación de los estudios Fase II en el interés de lograr la confirmación de las pruebas de eficacia de este candidato vacunal.

## CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

## INTRODUCCIÓN

Los avances actuales en materia de inmunoterapia activa específica con vacunas en melanoma no satisfacen las necesidades terapéuticas de la comunidad de pacientes afectados por esta enfermedad. La ausencia de reproducibilidad de los resultados obtenidos es la causa de que ninguna vacuna para melanoma haya logrado registro hasta el momento actual (Rosenthal y cols., 2008). Sin embargo, los pequeños éxitos alientan a la comunidad científica, que continúa explorando esta posibilidad terapéutica más segura y tolerable para el paciente que el resto de las variantes de inmunoterapia conocidas (Schlom, 2012). Una revisión de los resultados de la inmunoterapia activa específica realizada por la *Medical Policies; Melanoma vaccines* en su versión del 2011, mostró índices de respuesta objetiva tan bajos como el 3.8% del total de los pacientes tratados. Varias razones se invocan en el escaso éxito: el cuadro 2 resume las principales. Todas están presentes en el microambiente asociado al tumor en todos los estadios del melanoma en progresión y atentan contra el desarrollo de una respuesta inmune óptima. Por otra parte y en general, los pacientes incluidos en estos ensayos suelen carecer de la expectativa de vida necesaria para el largo proceso de instalación de una respuesta inmune efectiva (Rosemberg, 2004, Finke y cols., 2006 Ascierito y cols., 2011). No obstante todo lo anterior, esta terapéutica continúa despertando interés, debido a la prevalente opinión acerca de la utilidad del propio sistema inmune del paciente para destruir el tumor a un bajo costo en toxicidad en comparación con otros tipos de inmunoterapia. En este trabajo se exploró la posibilidad de utilizar el NeuGcGM3 como blanco terapéutico en el melanoma.

### *7,1 Expresión del gangliósido en los tumores primarios y las metástasis en ganglios linfáticos.*

El gangliósido NeuGcGM3 se encontró expresado en los tumores primarios y metástasis ganglionares en los pacientes estudiados de nuestra serie, con diversos grados de intensidad de reconocimiento por el AcM 14F7, sin presencia demostrable en la piel normal. La



expresión de este gangliósido generalmente se limita a la membrana celular, pero en las muestras estudiadas se observó también en el citoplasma de algunas células tumorales, quizás debido a la intensa actividad sintética en los orgánitos responsables en esta zona (Aparato de Golgi) o a cambios causados por la fijación de las muestras (Blanco y cols., 2012, artículo en publicación; Bodd y cols., 1990). NeuGcGM3 aparece en los tumores humanos asociado a dos mecanismos: el origen dietético y el metabolismo endógeno iniciado con el glicolil-CoA como precursor (Tangvoranuntakul y cols., 2003, Bardor y cols., 2005; Gabri y cols., 2009). Algunos autores sugieren una vía alternativa de síntesis del Neu5Gc a partir de otros intermediarios del metabolismo celular en el caso de algunos tumores (Malykh y cols., 2001). Otros gangliósidos aparecen en las células normales, como ejemplo el gangliósido GD3 en el citoplasma de las células neuronales maduras y la función Acetilada de GM3 (NeuAcGM3), que es un componente de la membrana en las células normales (Seyfried y cols., 1982; Tsuchida y cols., 1987; Svenerholm y cols., 1989; Kohla y cols., 2002). En este estudio, la ausencia de reactividad del 14F7 en los queratinocitos normales confirmó la selectividad de reconocimiento de este monoclonal por la función Nglicolilada de este gangliósido. Se estableció de esta manera el blanco para la inmunoterapia activa específica del melanoma cutáneo.

## *7,2 Seguridad*

Este trabajo describió las primeras experiencias con la administración de la formulación vacunal NeuGcGM3/VSSP por las vías IM y SC en pacientes con melanoma cutáneo y ocular avanzado. En general, los diferentes tipos de vacunas ensayadas en melanoma se caracterizan por su baja toxicidad y en este caso la vacuna demostró ser segura por ambas vías de administración, con toxicidad de leve a moderada y reversible en todos los casos. Los eventos adversos observados en la administración IM no fueron muy diferentes de los observados en los niveles de dosis equivalentes por la vía SC. Predominaron los eventos locales relacionados con

el sitio de inmunización, sobre todo en el caso de la administración IM, donde el uso del adyuvante oleoso pudo haber jugado un papel en su intensidad. Esta situación se observó previamente en los estudios pre clínicos con la vacuna NAcGM3/VSSP/ Montanide ISA 51, donde se utilizó la emulsión de Montanide ISA 51 como control en ratas y monos (Bada y cols., 2002; CENPALAB Informe, Julio 2003; Bada y cols., 2005) y en los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de mama avanzado (Carr y cols., 2003). La ausencia de eventos adversos locales de intensidad moderada a severa en los pacientes que recibieron la vacuna por la vía SC evidencia el posible papel causal del adyuvante. Las manifestaciones de toxicidad seudogripales ocuparon el segundo lugar en frecuencia, pero sin gran relevancia en cuanto a intensidad y duración en las dos vías de administración, lo que es común en las vacunas para agentes infecciosos y cáncer (Goyetche y cols., 2004; Ramanathan y cols., 2005; Eggermont y cols., 2009). Una observación relevante en este estudio fue el vitiligo que apareció en 4 pacientes, evento no reportado antes con esta formulación cuando se usó en pacientes con cáncer de mama (Carr y cols., 2003). En este caso, el vitiligo se indujo a pesar de que la vacuna no contenía antígenos presentes en los melanocitos normales. En el capítulo 3 de este trabajo se confirmó que en las muestras de piel normal no existía el NeuGcGM3 y adicionalmente se conoce que los gangliósidos no participan en las vías de síntesis de la melanina (Birklé y cols., 2000). De acuerdo a todo lo anterior, esta observación constituye el primer reporte de vitiligo relacionado con las inmunizaciones con una vacuna molecular de gangliósidos. Según de Gast GC, (observación no publicada) este evento ocurre de forma espontánea en menos del 0.1 % de los pacientes con melanoma en estadio IV, por lo que este hallazgo resulta de extremo interés. Como se expuso antes, los mecanismos responsables de la aparición del vitiligo en humanos sometidos a inmunoterapia no están aún bien definidos; estas lesiones se atribuyen a la presencia de células CD8+ específicas que causan pérdida de los melanocitos cutáneos (Yee y cols., 2000; Rocha y cols., 2000; Das PK, y cols., 2001; Lengagne y cols., 2004). La hipótesis

planteable en este caso es la reactivación de la respuesta inmune o “inmunorestauración” lograda, propiciadora de la presentación de otros antígenos de diferenciación presentes en el melanocito y no en la vacuna, con la reacción CD8+ antimelanocito y la respuesta específica de anticuerpos como manifestación de autoinmunidad ( Michelsen , 2009). Aunque el tema no está totalmente aclarado aún, algunos estudios sugieren el rol de las células T infiltrantes en la despigmentación que ocurre en pacientes con melanoma de forma espontánea o después de estrategias de vacunación (Jacobs y cols., 2009). La reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa detecta linfocitos T idénticos y clonalmente expandidos en el melanoma en regresión y en los halos de despigmentación que rodean al tumor (Garbelli y cols., 2005; Chang y cols., 2011). La vía específica de la destrucción no es conocida aún, una hipótesis planteada por algunos autores es la inducción de apoptosis por linfocitos específicos Melan-A-Mart-1 (Kiniwa y cols., 2001; Huang y cols., 2001; Michelsen, 2009). Tres de los 4 pacientes que presentaron vitíligo tuvieron respuesta antitumoral objetiva y tiempo de supervivencia prologados a pesar de lo avanzado de la enfermedad. Esto sin embargo, no se correspondió con una fuerte respuesta de anticuerpos contra el NGcGM3, pero la relación con el proceso de inmunización fue evidente ya que apareció durante las primeras 5 dosis y continuó a pesar de interrumpirse las mismas. Algunos autores han reportado la aparición de vitíligo en otros estudios; este hecho ha sido interpretado como un predictor de mejor evolución de la enfermedad en los pacientes con melanoma (Maire y cols., 2011). Gogas y cols. lo observaron en los pacientes tratados con IFN; Rosemberg lo describió durante el tratamiento de pacientes de melanoma con IL-2, pero no se observó en los pacientes tratados que presentaban carcinoma metastásico de células renales. Este tipo de evento no se reportó tampoco con la vacuna GM2-KLH-QS21 (Livingston y cols., 1994; Kirkwood y cols., 2001). La formulación vacunal NeuGcGM3/VSSP por la vía SC demostró ser segura, activa y capaz de inducir respuesta de anticuerpos a pesar de carecer de adyuvante en su composición. Todo lo anterior

y el hecho de no encarecer los costos de producción a pesar de incrementarse la dosis de la formulación la hacen idónea para el tratamiento. (Fernández y Mesa, 2001)

### 7, 3 *Inmunogenicidad:*

La vacuna fue inmunogénica en general. Los títulos pre inmunes para IgG e IgM se observaron en ambas vías de administración, pero el rango fue más amplio para IgM en la administración SC. Como se expresó anteriormente, la presencia de gangliósidos en los tumores se considera causa de inmunosupresión y por ende de progresión tumoral. Esto se debe fundamentalmente a su asociación con el cambio del patrón de respuesta inmunológica de tipo inflamatoria Th-1 a Th-2, (Crespo y cols., 2006). Según Ravindranath y cols., títulos elevados de IgM de forma endógena, son capaces de disminuir el volumen circulante de los gangliósidos liberados por el tumor a la circulación y su microambiente (Ravindranath y cols., 2002, 2007), por lo que las terapias que activamente o pasivamente lo logran, coadyuvan en la restauración de la inmunocompetencia y el enlentecimiento de la progresión tumoral (Gulley y cols., 2010,2011). Para afirmarlo es necesario el análisis de la presencia de gangliósidos en los tejidos tumorales y el suero de los pacientes, antes y después del tratamiento, estudio farmacodinámico que no se realizó en esta tesis. La implicación de los linfocitos T en la respuesta inmune ante los gangliósidos no era aceptada hasta hace poco debido al origen timo independiente de los mismos, sin embargo en los informes de Labrada y cols., se demuestra la implicación de la respuesta inmune celular en el efecto antitumoral generado por NeuGcGM3/VSSP (Labrada y cols., 2008, 2010). Los resultados de estos informes muestran el papel de la maduración de las células dendríticas y la acción de las poblaciones NK y TCD8+ en el mecanismo de acción antitumoral generado por la formulación NeuGcGM3/VSSP. En este trabajo no se pudo correlacionar la respuesta antitumoral con los títulos de anticuerpos, sin embargo, los títulos logrados modifican el criterio prevalente acerca de la baja inmunogenicidad de los

gangliósidos. Las características intrínsecas del preparado vacunal: su pequeño tamaño (nanopartícula) y la presencia de las proteínas del complejo de membrana externa de la *Neisseria meningitidis* (Campa y cols., 1988) como activadores de la inmunidad innata del paciente hacia los gérmenes gram negativos, condicionan también esta respuesta hacia los gangliósidos al presentarlos en este contexto. La vacuna GMK de Livingston y cols. desarrolló niveles de anticuerpos en rangos inferiores y principalmente de tipo IgM. Esta formulación contenía un gangliósido con baja inmunogenicidad (GM2), un carrier formado por una molécula de gran tamaño (Keyhole Limpet Hemocyanine) y un adyuvante(QS21) que aportaba poco a la inmunogenicidad del conjunto (Livingston y cols, 1994; Lens, 2008). Por el contrario, NeuGcGM3/ VSSP, superó estos inconvenientes al ser más inmunogénica y actuar los anticuerpos generados como secuestradores de antígenos (gangliósido NeuGcGM3). Esto causa la disminución de la inmunosupresión y propicia la inmunorestauración en el microambiente tumoral. Se conoce que el NeuGcGM3 liberado del tumor regula negativamente la molécula CD4 de los linfocitos humanos y murinos, particularmente en las células T CD4+CD25- (efectoras) y no en las de función T CD4+CD25+ reguladora (De león y cols., 2006). Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de los sueros post- inmunes inducidos por la vacunación con NeuGcGM3/ VSSP, para impedir esta regulación negativa inducida por el gangliósido (Mulens y cols., 2010). Lo anterior podría facilitar la función auxiliadora de las células T CD4+ a favor del patrón inflamatorio Th1; una de las condiciones necesarias para obtener respuesta antitumoral. Por otra parte, la citotoxicidad mediada por anticuerpos puede inducir la muerte celular mediada por complemento, situación ya demostrada por Carr y cols., con los sueros post-inmunes de pacientes con tumores de mama avanzado (Carr y cols., 2003). Estos anticuerpos tienen además capacidad lítica independiente de complemento y son gangliósido-específicos contra NeuGcGM3 (Carr y cols., 2000). Como dato adicional, existen evidencias experimentales que sugieren que la formulación vacunal NeuGcGM3 es capaz de estimular

la diferenciación y maduración de las células dendríticas y la infiltración del tumor por linfocitos T CD4+, T CD8+ y células B(CD19+) (Labrada y cols., 2010 a,b,y c.) . En este trabajo no se pudo evaluar esta respuesta por las limitaciones en las mediciones inmunológicas y los estudios sobre las metástasis; sólo se aportaron elementos clínicos para demostrar la presencia de actividad antitumoral relacionada con el proceso de la inmunización.

#### *7,4 Respuesta antitumoral.*

La presencia de respuesta objetiva antitumoral, junto a los resultados de SV obtenidos en los pacientes inmunizados con NeuGcGM3/ VSSP en los ensayos clínicos presentados, constituyen evidencias de actividad antitumoral de la formulación vacunal por las dos vías de administración. En ambos casos el 45% de los pacientes presentó algún grado de respuesta objetiva al tratamiento (RC/ RP/ EE). Predominaron las estabilizaciones tumorales en las dos series, con aumento de la mediana de SV global para el subgrupo de los pacientes respondedores. Este hecho, aunque sin criterios de validez externa, resulta representativo de alguna ventaja terapéutica. La respuesta objetiva en la inmunoterapia con diferentes preparados vacunales no es un hecho común ni de obtención rápida, suele observarse en pacientes tratados con Quimioterapia y Bioquimioterapia como resultado directo de la citotoxicidad, pero en el caso de las vacunas precisa el establecimiento previo de una respuesta inmune adecuada. Los fármacos citotóxicos afectan al tumor solamente durante el periodo de administración y poco después de discontinuado el tratamiento. La toxicidad, y los fenómenos de resistencia que se presentan con esta terapéutica hacen cesar la actividad antitumoral y resultan en el incremento de la tasa de crecimiento del tumor (Schlom, 2012). En el caso del tratamiento con vacunas el mecanismo de acción es diferente. Presentan una cinética de la respuesta clínica caracterizada por el enlentecimiento de la progresión tumoral que hace crónica la evolución y permite alargar la SV del paciente. (Gráfico 3). Las vacunas terapéuticas no actúan directamente

sobre el tumor sino sobre el individuo, a través de la aparición de la respuesta inmune que tarda en desarrollarse y que es la responsable de la citotoxicidad. Las reinmunizaciones potencializan su aparición y con la lisis tumoral, aparecen antígenos tumor asociados adicionales, de manera tal que el repertorio inmune se amplía y ocurre el “fenómeno de cascada” o “amplificación antigénica”. Este fenómeno se asocia a la aparición de diversos grados de respuesta antitumoral y se describió en la inmunoterapia con vacunas de péptidos (Ribas y cols., 2003). La aparición del Vitiligo en cuatro pacientes como manifestación de autoinmunidad, constituye una evidencia de la amplificación antigénica que permitió el reconocimiento de otros antígenos presentes en los melanocitos. Se asoció en estos cuatro pacientes con diferentes grados de respuesta antitumoral. Resulta evidente que las vacunas por sí mismas como monoterapia no tienen el poder de causar una reducción drástica del volumen tumoral, pero tienen el potencial de realizar su actividad antitumoral durante mucho tiempo, provocando un enlentecimiento del crecimiento del tumor (Gulley y cols, 2010,2011). Esta situación puede continuar por meses, o años y lo que es más importante, a través de tratamientos subsecuentes, lo que se traduce en aumentos de la supervivencia, con pequeña o ninguna diferencia en el tiempo para la progresión, y en ocasiones con un bajo grado o incluso ningún grado de respuesta antitumoral. (Hoss y cols, 2007; Stein y cols., 2011). Ese tipo de respuesta dio lugar a un cambio drástico en la evaluación de la respuesta antitumoral producida por la inmunoterapia (Hoss, 2011), (Criterios de respuesta inmunológica en tumores sólidos, 2009). En este trabajo fue evidente la aparición de respuesta antitumoral (45% aproximadamente en ambos ensayos clínicos), con predominio de la estabilización de la enfermedad (68% de las respuestas obtenidas), (15/22). Esta estabilización tumoral prolongada se observó en varios pacientes acompañada de la capacidad funcional adecuada para permitir la vida en equilibrio con la enfermedad. Esto constituye hoy el principal objetivo a lograr en pacientes con cáncer avanzado e incurable por los métodos terapéuticos oncoespecíficos

tradicionales. (Lage y cols., 2011; Wilhenhof y cols., 2011). Sin embargo, el tratamiento en pacientes con menor carga tumoral puede ser más eficaz (Wasif y cols., 2011; Gulley y cols., 2007). La inmunoterapia con otros fármacos como el Interferón produce respuestas objetivas en al menos 15% de los pacientes, con alta toxicidad y corta duración. En el caso de la IL-2, la diferencia estriba en la duración prolongada de las RC que se obtienen en menos del 4% de los mismos (Atkins y cols, 1999). La Quimioterapia con los fármacos tradicionales, (DTIC, sales de platino, Vinblastina) y los de última generación (Fotemustine, Temozolomida) unidos o no al Interferón o a la IL-2 no demostraron influencia en el retardo en la aparición de la progresión tumoral ni en el aumento de la supervivencia global (Avril y cols., 2004, Kim y cols., 2009). En general puede decirse que estos fármacos no han cambiado radicalmente el panorama de la enfermedad avanzada y metastásica. Ipilimumab (Hodi y cols., 2010) y Vemurafenib (Sennik, 2012) mostraron resultados terapéuticos en materia de respuestas y supervivencia global nunca antes logrados, situación ésta sin antecedentes en la historia de la terapéutica de esta enfermedad. Sin embargo, por las razones antes expresadas en esta tesis (Bronstein, 2011), resultan poco asequibles para la mayoría de pacientes con melanoma y no representan la solución terapéutica definitiva al problema. La terapia dirigida a dianas moleculares en la célula tumoral aunque constituye un revolucionario acercamiento a la terapéutica ideal, queda identificada como una forma de terapia personalizada, limitada para aquellos con la presencia de la alteración “blanco” en el tumor ( Yajima y cols., 2012). Esto resulta para Vemurafenib (mutación V006E del BRAF) (Dienstmann y Taberner, 2011). En nuestro caso, la inmunoterapia efectiva con NeuGcGM3/ VSSP estaría limitada a pacientes con expresión del gangliósido en el tumor, lo que indudablemente de cierta forma “personaliza” el tratamiento. La ausencia de predictores de respuesta es uno de los principales problemas a resolver en el tratamiento de los pacientes con melanoma avanzado. La presencia de un marcador pronóstico ayudaría en la selección de los pacientes para los diferentes tratamientos, evitando así riesgos innecesarios de



toxicidad. De acuerdo a los resultados obtenidos, en este trabajo, debe estudiarse con mayor profundidad la relación entre la respuesta pre inmune contra NeuGcGM3, la respuesta clínica y la SV como modo de buscar predictores de respuesta al tratamiento vacunal.

La formulación NeuGcGM3/VSSP demostró seguridad, inmunogenicidad en pacientes con melanoma avanzado irreseccable. En un subgrupo de los pacientes vacunados se evidenció respuesta antitumoral e incremento de la SV global. Los antecedentes pre clínicos sustentan el efecto antitumoral de esta vacuna y al gangliósido NeuGcGM3 como un blanco terapéutico en pacientes con melanoma. Quedó establecida la prueba de principio para la formulación vacunal NeuGcGM3/VSSP. Puede inferirse con estos resultados que el escenario ideal para esta inmunoterapia activa específica sería el adyuvante en los pacientes con alto riesgo de recaídas, donde el estado inmunológico menos comprometido del paciente, la baja carga tumoral y el mejor funcionamiento de órganos y sistemas permitirían la inducción de una respuesta inmune capaz de causar respuesta antitumoral activa. La expectativa de vida del paciente en esta situación clínica permite realizar un tratamiento lo suficientemente prolongado para inducir la aparición de una respuesta inmune adecuada. Los resultados obtenidos justifican la realización de ensayos clínicos de eficacia. Adicionalmente, debe ampliarse la evaluación de esta formulación en pacientes con melanoma uveal y oral donde existen evidencias preliminares de expresión del antígeno NeuGcGM3. La estrategia de combinación de inmunoterapias con diferentes mecanismos de acción con la quimioterapia debe investigarse en la búsqueda de mejores resultados, conocidas la sinergia con diversos fármacos, la heterogeneidad del melanoma, su natural eficiencia en desarrollar mecanismos de “escape” y su respuesta ante la manipulación inmunológica (Gulley y cols., 2007). Ensayos clínicos para evaluar la eficacia de esta formulación en Melanoma cutáneo y ocular serán el nuevo propósito.

### *7,5 Conclusiones*

Los resultados mostrados en cuanto a expresión en los tumores primarios y sus metástasis linfáticas, seguridad, inmunogenicidad y respuesta antitumoral, unidos a los datos de SV obtenidos en los pacientes con la aplicación de NeuGcGM3/VSSP, reafirman la posición del gangliósido NeuGcGM3 como blanco terapéutico en pacientes con melanoma y permiten considerar la realización de estudios de eficacia con esta preparación vacunal en diferentes escenarios terapéuticos.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- El gangliósido NeuGcGM3 se expresa en los melanomas primarios y sus metástasis locorreionales, lo cual sugiere que puede ser un blanco terapéutico para esta enfermedad
- La vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP administrada por la vía subcutánea o por la vía intramuscular con Montanide ISA 51 es segura en un esquema de 15 dosis (un año de tratamiento) en pacientes con melanoma avanzado irresecable o metastásico.
- La inmunogenicidad de la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP se evidencia con la generación y/o incremento de los títulos de anticuerpos contra NeuGcGM3, en pacientes con melanoma avanzado irresecable o metastásico, al administrarse por la vía subcutánea o intramuscular con Montanide ISA 51
- La vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP es capaz de generar respuesta clínica objetiva (respuesta completa, respuesta parcial o estabilización) en un subgrupo de pacientes con melanoma avanzado irresecable o metastásico e incrementar en estos la mediana supervivencia global.

## RECOMENDACIONES

## RECOMENDACIONES.

1. Ampliar la evaluación Inmunohistoquímica de la expresión del gangliósido NeuGcGM3 en melanomas uveales y en metástasis a distancia de cualquier tipo de melanoma.
2. Realizar ECs Fase II con la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP en pacientes con melanoma metastásico y en el escenario adyuvante.
3. Evaluar el efecto de largos períodos de inmunización en la inmunogenicidad, la respuesta clínica antitumoral y en la supervivencia global de los pacientes con melanoma.
4. Evaluar el valor predictor de la respuesta pre inmune contra el gangliósido NeuGcGM3 en la respuesta clínica antitumoral y en la supervivencia global de los pacientes con melanoma.
5. Evaluar el valor pronóstico de la respuesta preinmune contra el gangliósido NeuGcGM3 en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global de los pacientes con melanoma en etapas tempranas.
6. Estudiar la contribución de las diferentes poblaciones del sistema inmune en la respuesta antitumoral generada por la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP en pacientes con melanoma.
7. Explorar la combinación de la vacuna con otros tratamientos contra melanoma donde se incluyan las estrategias de intervención sobre circuitos de regulación del sistema inmune.

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

1. **Agarwala SS.**, Panikkar R., Kirkwood JM. Phase I/II randomized trial of intrahepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin and chemoembolization with cisplatin and polyvinyl sponge in patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Melanoma Res* 2004;14:217
2. **Agarwala SS**, Kaane JM, Guadagnolo BA et al. The benefits of adjuvant radiation therapy after therapeutic lymphadenectomy for clinical advanced, high risk, lymph node metastatic melanoma. *Cancer* 2009a, 115: 5836-5844
3. **Agarwala SS.** Current systemic therapy for metastatic melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009b; 9(5):587–95
4. **Andtbacka RH.**, Gershwald JE. Role of sentinel – node biopsy in patients with thin melanoma. *J Natl Compr Can Ntw.* 2009; 7: 308-317
5. **Apostolopoulos V.**, Ling J., and Werner D. Cancer vaccines methods for inducing immunity. *Expert rev vaccines* 2008; 7(7) 861-862
6. **Arienti F.**, Belli F., Napolitano F. Vaccination of melanoma patients with Interleukin 4 gene-transduced allogenic melanoma cells. *Hum gene Ther* 1999; 10: 2907-16
7. **Ascierto P.**, Grimaldi AM., Curti B., Faries MB., Ferrone F., Falherty K. et al. Future perspectives in melanoma research. Meeting Report from the melanoma Research, a bridge from Naples to the World. Dec 5<sup>th</sup> -6 th. 2011. *Transl Med* 2012; 10:83
8. **Atkins MB.**, Lotze MT., Dutcher JP. High-dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J ClinOncol.*1999;17:2105-2116
9. **Atkins MB.**, Kunke IL., Sznol M., Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin- 2 therapy in patients with metastatic melanoma: long –term survival update. *Cancer J Sci Am.* 2000; 6(supp 1): S11-S14
10. **Atkins MB.** Interleukin-2: Clinical applications. *Semin Oncol* 2002;29(3):12–7
11. **Atkins MB.**, Hsu J. and Lee S. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2 and interferon  $\alpha$ -2b with cisplatin,vinblastine,dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695). A trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group.*J Clin Oncol* 2008 dec 10;26(35) 5746-5754
12. **Aucouturier J.**, Dupuis L., Deville S., Ascarateil S. and Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1:111-18
13. **Avril MF.**, Aamdal S., Grob JJ., Hauschild A., Moh P., Bonerandi JJ. et al: Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol.* 2004 Mar 15;22(6):1118-25
14. **Bada A.**, Casacó A., Arteaga M., Martínez J., León A., Santana E., et al. Toxicity of a GM3 cancer vaccine in *Macaca fascicularis* monkey: a 12 month study. *Human and Experimental Toxicology* 2002; 21: 263- 67



15. **Bada AM.**, Casacó A., Mancebo A., Fuentes D. Gonzalez B., Hernández O. et al. Acute and Repeated Dose Intramuscular Toxicity of GM3 cancer vaccine in SD rats *Pakistan Journal of Biological sciences* 2005; 8: 1045-50
16. **Balch CM.**, Gershenwald JE., Thompson JF., Soong SJ., Reintgen DS., Cascinelli N. et al. Prognostic factors analysis of 17600 patients: validation of the new American Joint Committee on Cancer melanoma staging System *J Clin Oncol.*2001;19: 3622-3634
17. **Balch CM.**, Gershenwald JE., Soong SJ., Thompson JF., Chapman PB., Lee JH et al: Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-206
18. **Ballo MT.** and Ang KK. Radiotherapy for Cutaneous malignant Melanoma. Rationale and indications. *Oncology (Williston Park)* 2004; 18: 99-107
19. **Bardor M.**, Nguyen DH., Díaz S, and Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *Journal of Biological Chemistry* 2005; vol.280 no.6 4228–4237
20. **Belli F.**, Testori A., Rivoltini L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumour-derived heat shock protein gp96 complexes: clinical and immunological findings. *J Clin Oncol* 2002;20: 4169-80
21. **Berd D.**, Sato T., Cohn H.. Treatment of metastatic melanoma with autologous, hapten modified melanoma vaccine: regression of pulmonary metastases. *Int J Cancer* 2001; 94(4):531–9.
22. **Berinstein NL.** Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine* 25S (2007) B72–B88
23. **Berinstein NL.** Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model *Ann NY Acad Sci* 2009; 1174:107-17
24. **Birklé S.**, Gao L., Zeng G. and Yu RK. Down-regulation of GD3 ganglioside and its O-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth, melanogenesis, and dendricity. *J Neurochem.* 2000; 74(2):547-54
25. **Bjune G.**, Hoiby EA., and Gronnesby JK. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet.* 338:1093-1096, 1991
26. **Blanco R.**, Cedeño M., Escobar X., Blanco D., Rengifo CE., Frómata M., Alvarez RI., Rengifo E. and Carr A. Immunorecognition of the 14F7 Mab Raised against N-GlycolylGM3 Ganglioside in Some Normal and Malignant Tissues from Genitourinary System *ISRN Pathology* Volume 2011(a), Article ID 953803,10 pages doi: 10.5402/2011/ 953803
27. **Blanco R.**, Rengifo E., Cedeño M., Rengifo C., Alonso D. and Carr A. Immunoreactivity of the 14F7 Mab raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Epithelial Malignant Tumors from Digestive System *ISRN Gastroenterology* Volume 2011(b), Article ID645641, 8 pages doi:10.5402/2011/645641
28. **Boasberg PD.**, Hoon DSB., Piro LD., Martin MA., Fujimoto A., Kristedja TS., Bhachu S., Ye X., Deck RR., and O'Day SJ. Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *J. of Investigative Dermatology* 2006; 126: 2658-63

29. **Bodd HE.**, Holman B., Spies F. et al. Freeze-fracture electron microscopy of in vitro reconstructed human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 1990 vol.95 no. 1 108–116
30. **Boehm AL.**, Higgins J., Franzusoff A., Schlom J., Hodge JW. Concurrent vaccination with two distinct vaccine platforms targeting the same antigen generates phenotypically and functionally distinct T-cell populations. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59(3):397–408
31. **Boesch CE.**, Meyer T., Waschke I. . Long term outcome of Hyperthermic isolated limb perfusion (HILP) in the treatment of locoregional metastasised melanoma of the extremities. *Int J Hyperthermia* 2010; 26:16-20
32. **Brahmer JR.**, Drake CG., Willner C. Phase I study of Etaracizumab (Abegrin) *J Clin Oncol* 2010, 28(19): 3167-3175 Pubmed 20516446
33. **Bronstein D.** Pharmacy practice news. Issue: august 2011 | volume: 38:08 who Benefits the Most from Ipilimumab Restricted Distribution? Some question Safety/REMS rationalh. <http://www.pharmacypracticenews.com/viewArticle>
34. **Bronstein Y.**, Ng CS., Rohren E, Rosso ML., Lee JE., Cormier J, Jhonson VE., Hwu WJ. PET/CT in the management of patients with stage IIIc and IV metastatic melanoma considered candidates for surgery. Evaluation of the addition value after conventional imaging. *A J Roentgenol* 2012; 198 (4): 902-08
35. **Buzaid AC.** and Atkins M. Practical Guidelines for the Management of Biochemotherapy-related Toxicity in Melanoma *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 2611–2619
36. **Bystrin JC.**, Jacobson S., Harris M. Preparation and characterization of a polyvalent human melanoma antigen vaccine. *J Biol Resp Mod* 1986; 5:211
37. **Bystryn JC.**, Rigel D., Friedman RJ., Kopf A. Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1987;123:1053-5
38. **Campa C.**, Sierra GV., Gutiérrez MM., García L., Puentes GC., Sampedro MC. Et al. Vaccine against Group C N. Meningitides. Gammaglobulin and transfer factor, European patent 0301992(1988)US patent US5597572
39. **Cancer Therapy Evaluation program.** Common Terminology Criteria for Adverse events. (CTCAE) Version 3.0 DCTD, NCI, NIH, DHHS. March 31 2003 <http://ctep.cancer.gov> Publish date: August 9 , 2006
40. **Cui R.**, Widlund HR., Feige EL. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 2007;128(5):853
41. **Market Wire.** 24 March 2006 [cited 12 April 2007]. <http://www.marketwire.com> Canvaxin™ in patients with stage III and stage IV melanoma. Results of phase III clinical trials
42. **Carr A.**, Rodriguez E., Arango MC., Camacho R., Osorio M., Gabri M., et al. Immunotherapy of Advanced Breast Cancer with a Heterophilic Ganglioside (NeuGcGM3) *Cancer Vaccine. J Clin Oncol* 2003; 21: 1015-21
43. **Carr A.**, Mullet A., Mazorra Z. Vázquez AM., Alfonso M., Mesa C. et al. A mouse IgG monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000; 19( 3): 241–247

44. **Carubia JM.**, Yu RK. and Macal J. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes . Biochemical and Biophysical Research Communications 1984; 120(2):500–504
45. **CENPALAB Código NGDR0802.Informe.** Toxicidad a dosis repetida por vía intramuscular de la vacuna terapéutica contra cáncer NGcGM3 en ratas Cenp: SPRD. Estudio de 14 días Julio 2003 (a)
46. **CENPALAB Código NGDR0203 . Informe.** Toxicidad a dosis repetida por vía SC de la vacuna terapéutica contra cancer NeuGcGM3 en ratas Cenp: SPRD. Estudio de 14 días. Julio 2003 (b)
47. **Chang GY.**, Kohrt HE., Stuge TB., Schwartz EJ., Weber JS., Lee PP. Cytotoxic T lymphocyte responses against melanocytes and melanoma J Transl Med 2011;9(1):122-124
48. **Chabner BA.**, Amrein PC., Druker BJ., Michelson MD., Mitsiades CS., Goss PE., et al. Antineoplastic Agents. Section IX. En: Goodman and Gillman's The Pharmacologic Basis of Therapeutic. 11<sup>th</sup> edition 2006. McGraw-Hill Medical Publishing Division. New York. Edts: Brunton LL., Lazo J. and Parker KL.
49. **Chang AE.**, Karnell LH., Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer 1998; 83:1664
50. **Chapman PB.**, Einhorn LH., Meyers L. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus Dacarbazine in patients with metastatic melanoma . J Clin Oncol 1999;17: 2745-2751
51. **Chapman PB.**, Hauschild A., Robert C., Larkin J., Haanen BAG., Ribas AG. BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. The New England Journal of Medicine. 2011;364(26):2507–2516
52. **Chapman PB.**, Hauschild A., Robert C., Larkin J., Haanen BAG., Ribas AG. et al. Updated overall survival (OS) results for BRIM-3: a phase III randomized, open-label multicenter trial comparing BRAF inhibitor Vemurafenib (Vem) with Dacarbazine (DTIC) in previously untreated patients with BRAF V600E-mutated melanoma . Abstract 8502. Proceedings of ASCO Meeting 2012
53. **Cheever MA.**, Allison J. P., Ferris AS . The prioritization of cancer antigens: a National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. Clinical Cancer Research, 2009; 15 (17): 5323–5337
54. **Chen JY.**, Hruby G., Scolyer RA. Desmoplastic neurotropic melanoma. a clinicopathologic analysis of 128 cases. Cancer. 2008; 113: 2770-2778
55. **Chin L.**, Garraway LA., Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. Gene Develop 2006;20(16):2149
56. **Collinson FJ.**, Lam TK., Bruijn WM., de Wilt JH., Lamont M., Thompson JF., Kefford RF. Long-term survival and occasional regression of distant melanoma metastases after adrenal metastasectomy 2008;15(6):1741-1744
57. **Crespo F.**, Xichun S., Cripps JG. and Fernandez-Botran R. The immunoregulatory effects of gangliosides involve immune deviation favoring Type -2 Tcell responses. J.Leuk Biol 2006;(79) 586-595

58. **Curti D.**, Urban W. Integrating new therapies in the treatment of advanced melanoma. *Curr Treat Op Oncol* 2012; DOI 10.1007/s11864-012-0201-9 Skin cancer WH. Sharfman Section editor. Springer Verlag Science + Business media LLC
59. **Curtin JA.**, Fridlyand J, Kageshita T. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135
60. **Dalgleish AG.**, Whelan MA. Cancer vaccine as a therapeutic modality: the long trek. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1025-1032
61. **Damato B**, Lecuona K. Conservation of eyes with choroidal melanoma by a multimodality approach to treatment: an audit of 1,632 patients. *Ophthalmology* 2004;111:977.
62. **Das PK.**, Van der Wijngaard RM, Wankovics Kalinska A, le Poole IC. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol* 2001; 22:1306
63. **Datos del RNC Cuba**
64. **de Gast G.C.**, MD, PhD, Professor of Clinical Immunotherapy, Department of Medical Oncology, The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, the Netherlands; información no publicada
65. **De León J.**, Fernández A, Clavell M et al. Differential influence of the tumour-specific non-human sialic acid containing GM3 ganglioside on CD4+CD25- effector and naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells function. *International Immunology*, 2008; 20(4): 591-600
66. **De León J.**, Fernández A, Mesa C, M. Clavel M, and Fernández LE. Role of tumour-associated N-glycosylated variant of GM3 ganglioside in cancer progression: effect over CD4 expression on T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006; 55(4): 443-450
67. **De Vita VT.**, Hellman A., Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice* 8<sup>th</sup> edition, Chapter 25. Melanoma. Walters Kluwer, Williams and Wilkins, Lippincott 2008
68. **De Vries E.**, Bray FI, Coeberg JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997. Rising trends in incidence and mortality. *Br J Dermatol*, 2006; 154: 539-541
69. **Diaz Rubio E.**, *Oncometun* 2005, Schering-Plough, Publicaciones Permanyer Agents Med Chem 2011; 11 (3)285-295
70. **Dienstmann R.**, Tabernero J. BRAF as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011; 11(3):285-95
71. **Dillman RO.**, Barth NM, Vander Molen LA, Mahdavi K, McClure SE. Should high-dose interleukin-2 still be the preferred treatment for patients with metastatic melanoma *Cancer? BiotherRadiopharm*. 2012; 27(6):337-43
72. **Dillman RO.**, Fogel GB., Cornforth AN., Selvan SR., Schiltz PM. and DePriest C. Features associated with survival in metastatic melanoma patients treated with patient-specific dendritic cell vaccines. *Cancer Bioth Radioph* 2011; 26(4):407-15
73. **Dippold WG.**, Dienes HP. and Knuth A. Immunohistochemical localization of ganglioside GD3 in human malignant melanoma, epithelial tumors and normal tissues. *Cancer Res* 1985;45 (8): 3699-3705
74. **Doré JD.**, Portoukalian J., Berthier Vergnes O., Jacobovich R., Geneve J., Bailly M., Leftheriotis E., Weissbrod A. and Mayer M. Réponse des malades atteints de mélanome à l'

- immunisation pour oncolisats de mélanome au virus de la vaccine. Bull Cancer 1990; 77: 881-891
75. **Dudley ME.**, Yang JC., Sherry R. et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. J Clin Oncol. 2008; 26:5233-5239
  76. **Eggermont AM.**, Gore M. Randomised adjuvants trials in melanoma: surgical and systemic. Sem Oncol 2007; 34:509-515
  77. **Eggermont AM.**, Suciú S., Santini M. et al. Adjuvant therapy with pegylated Interferon alfa 2b vs observation alone in resected stage III melanoma patients. Results of a randomized Phase III trial. Lancet 2008; 37(3):302-311
  78. **Eggermont AM.** Therapeutic vaccines in solid tumours: can they be harmful? Eur J Cancer 2009; 45(12):2087-90
  79. **Erdel E.** and Torres S. A new understanding in the epidemiology of malignant melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 2010; 10(11): 1811-1823
  80. **Estévez F.**, Carr A., Solórzano L., Valiente O., Mesa C., Barroso O., Sierra GV., Fernandez LE. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes ( VSSP ) Vaccine 2000; 18: 190-7
  81. **Faries MB.** and Morton DL. Editorial. The Promise of Metastasectomy in Melanoma. Ann Surg Oncol, 2006; 13(5):607-609
  82. **Faulkner-Jones BE.**, Foster WD., Harbour JW. Fine needle aspiration biopsy with adjunct immunohistochemistry in intraocular tumor management. Acta Cytol 2005; 49:297
  83. **Feldman ED.**, Pingpank JF., Alexander HRJ. Regional treatment options for patients with ocular melanoma metastatic to the liver. Ann Surg Oncol 2004;11:290.
  84. **FDA approves new treatment for a type of late-stage skin cancer.** march 25,2011. Available at: [www.fda.gov/newsevents/newsroom/press\\_announcement /ucm\\_1193237](http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/press_announcement/ucm_1193237) accesed January 2011
  85. **FDA Yervoy (Ipilimumab).** Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS): Severe immune-mediated adverse reactions. April 6, 2011. Available at: [www.fda.gov/safety/medwatch/safety\\_informations/safety\\_alerts\\_for\\_human\\_medical\\_products / ucm\\_249770 htm](http://www.fda.gov/safety/medwatch/safety_informations/safety_alerts_for_human_medical_products/ucm_249770.htm). Accesed Jan 26 2012
  86. **Fernández LE.** y Mesa C. Composiciones vacunales a base de gangliósidos para administración subcutánea. Patente EP 1604683
  87. **Fernández LE.**, Alonso DF., Gómez DE. and Vázquez AM. Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. Expert Rev. Vaccines 2003; 2(6), 321-327
  88. **Fernandez LE.**, Gabri MR. , Guthmann MD., Gomez RE., Gold S., Fainboim L. et al. Review Article. NGcGM3 Ganglioside: A Privileged Target for Cancer Vaccines Clin Dev Immunol 2010 vol 10 article 819347 8 pages doi:10.1155/2010/814397
  89. **Finke LH.**,Wentworth K., Blumenstein B., Rudolph NS., Levitsky H., Hoos A., Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies—Outcomes from the 2006 Meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC) Vaccine 25 S (2007) B97–B109

90. **Finn L.**, Markovik SN. and Joseph RW, Therapy of metastatic melanoma: the past, present and future. BMC Medicine 2012; 10: 23
91. **Fisher DE.**, Barnhill R., Hodi FS. et al. Melanoma from bench to bedside: meeting report from the 6<sup>th</sup> International Melanoma Congress. Pigmented Cell Res. 2010; 23:14-26
92. **Fishman PH.** and Brady, R.O. Biosynthesis and function of gangliosides. Science 194: 906-915, 1976
93. **Flaherty KT.**, Yasothan U., Kirkpatrick P. Vemurafenib. Nat Rev Drug Disc 2011; 10(11):811-2
94. **Folch PJ.**, Arsove S., Meath JA. Isolation of brain stradin, a new type of large molecular tissue component. J Biol Chem 1957; 226:497-509
95. **Gabri MR.**, Otero LL., Gómez DE. and Alonso DF. Exogenous incorporation of NeuGc-rich mucin augments N-Glycolyl sialic acid content and promotes malignant phenotype in mouse tumor cell lines. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 2009; 28 (1)146
96. **Garbe C.**, Eigentler TK., Keiholtz U., Hauschild A. and Kirkwood J. Systematic review of medical treatment in melanoma current status and future prospsects. Oncologist 2011;(1):5-24
97. **Garbelli S.**, Mantovani S., Palermo B., Giachino C. Melanocyte-specific, cytotoxic T cell responses in vitiligo: the effective variant of melanoma immunity. Pig cell Research 2005;18(4):234-42
98. **Garnett CT.**, Schlom J., Hodge JW. Combination of docetaxel and recom binant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. Clin Cancer Res. 2008;14(11):3536–3544
99. **GCP Consolidated Guideline** 5.13, 5.14 ICH tópico E6 Junio 2001
100. **Geller AC.**, Sweeter SM., Brooks K., Demierre MF. and Yaroeh AL . Screening, early detection and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions, JAM Acad Dermatol. 2007; 57 (84): 555-572
101. **Gershenwald JE.**, Mansfield PF., Lee JE., Ross MI. Role for lymphatic mapping and sentinel biopsy in patients with thick (> or = 4 mm) primary melanoma. Ann Surg Oncol 2000;7:160-164
102. **Giblin ME.**, Shields JA., Shields CL. Ocular melanoma. En: Textbook of Melanoma. Cap 63. Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR Editors. Martin Dunitz. Taylor and Francis Group. London–New York. 2004
103. **Goel VK.**, Lazar AJ., Warneke CL. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. J Invest Dermatol 2006;126(1):154.
104. **Gogas H.**, Loannovich J., Dafni U., Stavropoulou-Giokas C., Frangia K., Tsoutsos D., et al. Significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. N Engl J Med 2006; 354: 709-18
105. **Goldstein AM.**, Falk RT., Frazer MC. Sun related risk factors in melanoma –prone families with CDKN2A mutations. J Natl Cancer Inst.1998, 90(9):709-11
106. **Goyetche R.**, Pérez A., Morena G., Pérez G., Giachetto G., Pérez MC. y cols. Efectos adversos asociados a la vacuna antimeningocócica VAMENGOCC-BCR. Rev Med Uruguay 2004; 20: 102-105
107. **Grandini S.**, Sera F., Cataruzza MS . Metanalysis of risk factors for cutaneous melanoma II. Sun exposure. Eur J Cancer 2005;41: 45-50

108. **Grosenbach DW.**, Barrientos JC., Schlom J., Hodge JW. Synergy of vaccine strategies to amplify antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Cancer Res.* 2001;61(11):4497–4505
109. **Grotz TE.**, **Mansfield AS.**, **Jakub JW.**, **Markovic SN.** . Regional lymphatic immunity in melanoma. *Melanoma research* 2012; 22(1):9-18
110. **Gulley JL.**, Madan RA., Arlen PM. Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. *Review. Vaccine* 25S (2007) B89–B96
111. **Gulley JL.**, Arlen PM., Hodge JW., Schlom J. Vaccines and immunostimulants. In: Hong W. ed. *Cancer Medicine* 8. Shelton, CT: People’s Medical Publishing House-USA. 2010; 725–736
112. **Gulley JI.**, Madam RA., Schlom J. The impact of tumour volumen on potencial efficacy of therapeutic vaccines (Review). *Curr Oncol* 2011;18(3) 50-57
113. **Guo J.** and Kong Y. Phase II open- label single- arm trial of Imatinib Mesylate in patients with metastatic melanoma harbouring c-kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 2011; 29:2904-9
114. **Hakomori S.** Bifunctional role of glycosphingolipids: Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 1990; 265; 18713-18716
115. **Hamid WJ.**, Hwu JM., Richards JS., Wolchok JD., Sznol M. Ipilimumab (Ipi) expanded access program (EAP) for patients (pts) with stage III/IV melanoma: 10mg/kg cohort interim results Proceedings of ASCO Meeting 2012
116. **Harbour JW.**, Brantley MA., Hollingsworth H., Gordon M. Association between posterior uveal melanoma and iris freckles, iris naevi, and choroidal naevi. *Br J Ophthalmol* 2004;88:36
117. **Haushild A.**, Agarwala SS., Trefzer U. Results of a phase III randomized, placebo controlled study of Sorafenib in combination with Carboplatin and Paclitaxel as second line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 2009; 27:2823-2830
118. **Haushild A.**, Dummer R., Ugurel S. Randomized dose escalation study evaluating peginterferon alfa 2a in patients with metastatic malignant melanoma *J Clin Oncol* 2006; 24:1188-1194
119. **Henderson MB.**, Burmeister B., Thompson JF. Adjuvant Radiotherapy and lymph node control in melanoma patients after lymphadenectomy.results of an intergroupo randomized trial ANZMTG 01.02/ TROG 0.2 0.1 ( abstract) *J Clin Oncol* 2009, 27 (Suppl 18);LBA9084
120. **Herndon TM.**, Demko SG., Jiang X., Kun H., Gootenberg KJ., Cohen MH. et al. U.S. Food and Drug Administration Approval: Peginterferon-alfa- 2b for the AdjuvantTreatment of Patients with Melanoma *The Oncologist* 2012;17:1323–1328
121. **Hersey P.**, Coates AS., McCarthy WH. et al. Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of melanoma: results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 2002; 20(20):4181-90
122. **Higashi H.**, Naiki M., Matuo S., and Okouchi K. Antigen of serum sickness type of heterophile antibodies in human sera: identification as gangliosides with N-glycolyl neuraminic acid *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977; 79 (2): 388–395
123. **Hodi FS.**, O’Day SJ., McDermott DF., Weber RW., Sosman JA., Haanen JB., et al. Improved survival with ipilimumabin patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363:711–23
124. **Hoos A.**, Britten CM., Huber C., Donnell-Tormey JO. A methodological framework to enhance the clinical success of cancer immunotherapy. *Nature Biotechnology.* 2011; 29 (10): 233-236
125. **Hoos A.**, Parmiani G., Hege K., Sznol M., Loibner H., Eggermont A ., Urba W. et al. A Clinical Development Paradigm for Cancer Vaccines and Related Biologics *J Immunother* 2007; 30:1–15

126. **Howlader N.** et al. Improved estimates of cancer specific survival rates from population based data. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(20):1584-1588
127. **Huang CL.**, Nordlung JJ., Boissy R. Vitiligo, a manifestation of apoptosis. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 301-308
128. **Inamdar GS.**, Madhunapantula SV. and Robertson GP. Targeting the MAPK Pathway in Melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(5): 624–637
129. **Inmann S.** Vemurafenib receives approval for metastatic melanoma published online august 17<sup>th</sup> 2011. <http://www.onclive.com>
130. **Irie A.**, Koyamat S., Kozutsumi Y., Kawasaki T. and Suzuki A. The molecular basis for the absence of N-glycolyl neuraminic acid in humans, *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273 (25): 15866–15871
131. **Jacobs JF.**, Aarntzen EH., Sibelt LA., Blokx WA., Boullart AC., Gerritsen MJ. Vaccine-specific local T cell reactivity in immunotherapy-associated vitiligo in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunotherapy* 2009;58(1):145-51
132. **Jemal A.**, Spiegel R., Naidshadham D. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin* (60) 5: 227-300
133. **Jemal A.**, Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 52: 23-47
134. **Jimbow K.**, Salopek TG., Dixon WT. et al. The Epidermal Melanin Unit in the pathophysiology of malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1991;13 :179-88
135. **Kawachi S.** and Saida T. Analysis of the expression of Hanganutziu Deicher (HD) antigen in human malignant melanoma. *Journal of Dermatology* 1992; 19 (11): 827–830
136. **Kawai T.**, Kato H., Higashi AH., Kato S. and Naiki M. Quantitative determination of N-glycolyl neuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor-associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Research* 1991; 51(4): 1242–1246
137. **Kim KB.**, Legha SS., González R., Anderson CM., Johnson MM., Liu P., Papadopoulos NE., Eton O., Plager C., Buzaid AC., Prieto VG., Hwu WJ., Frost AM., Alvarado G., Hwu P., Ross MI., Gershenwald JE., Lee JE., Mansfield PF., Benjamin RS., Bedikian AY. A randomized phase III trial of biochemotherapy versus interferon-alpha-2b for adjuvant therapy in patients at high risk for melanoma recurrence *Melanoma res* 2009; 19(1):42-9
138. **Kiniwa Y.**, Fujita T., Akada M., Shofuda T., Suzuki Y., Yamamoto A. et al: Tumor antigens isolated from a patient with Vitiligo and T cell infiltrated melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7900-7907
139. **Kirkwood JM.**, Strawderman MH., Ernstoff MS. et al. Interferon alpha 2b adjuvant therapy in high-risk resected cutaneous melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; 14: 5509-15
140. **Kirkwood JM.**, Ibrahim JG., Sondak VK. et al. High and low dose Interferon alpha 2b in high risk melanoma: first analysis of Intergroup trial E1690. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2444-2458
141. **Kirkwood JM.**, Ibrahim JG., Sondak VK., Agarwala SS., Ernstoff MS., Rao U. 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* 2001; 19: 2370-80



142. **Kirkwood JM.**, Tarhini AA., Panelli MC., Moschos SJ., Zarour HM., Butterfield LH. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(20):3445-55
143. **Kirkwood JM.**, Lee S., Moschos SJ., et al. Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine+/-granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:1443–1451
144. **Kirkwood JM.**, Butterfield LH., Tarhini AA., Zarour H., Kalinski P., Ferrone S. et al: Immunotherapy of Cancer in 2012 . *CA Cancer J Clin* 2012; 61: 000-000 © 2012 American Cancer Society
145. **Khaled M.**, Larribere L., Bille K. Microphthalmia associated transcription factor is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *J Invest Dermatol* 2003;121(4):831
146. **Kivela T.**, Makitie T, Al-Jamal RT, Toivonen P. Microvascular loops and networks in uveal melanoma. *Can J Ophthalmol* 2004;39:409
147. **Klages K.**, Mayer CT., Lahl K., Loddenkemper C., Teng MWL., Ngiow SF., Smyth MJ., Hamann A., Huehn J. and Sparwasser T. Selective Depletion of Foxp3+ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against established Melanoma. *Cancer Res* 2010; 70:7788-7799
148. **Koda T.**, Shimosakoda T., Asaoka H. et al.Detection of the Hanganutziu-Deicher antigen in patients with hepatocellular carcinoma. *Int Hepatol Commun* 1994; 2:310-315
149. **Kodumudi KN.**, Woan K, Gilvary DL, et al. A novel chemo immuno modulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res.* 2010;16(18):4583–4594
150. **Kohla G.**, Stockflet E. and Schauer R. Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochemical Research*, 2002;.27(7-8): 583–592
151. **Kotelianskii EO.** Immunoglobulins M, G and A as prognostic criteria of the treatment outcome in uveal melanoblastoma. *Allerg Immunol (Leipz)*1981;27: 14-21
152. **Labrada M.** y cols. DOT-308/27 Evaluación de la respuesta antitumoral de ratones vacunados con NGcGM3/VSSP por la vía SC o con NGcGM3/VSSP/Montanide ISA 51 por la vía IM. 2008
153. **Labrada M.**, Clavell M., Bebelagua Y., De león J., Alonso D., Gabri G. et al. Direct validation of NeuGcGM3 ganglioside as a new target for cancer immunotherapy. *Expert Opin.Biol.Ther*(2010)10(2):153-162
154. **Labrada M.** y cols. DOT-310/02 Evaluación del papel de las células CD8+ en la respuesta antitumoral de ratones tratados con la vacuna NGcGM3/VSSP subcutánea no emulsiva. 2010 a
155. **Labrada M.** y cols. DOT 310/03 Evaluación de la maduración de células dendríticas in vivo en animales vacunados con NGcGM3/VSSP. 2010b
156. **Labrada M.** y cols . DOT-310/04 Evaluación del papel de las células NK en la respuesta antitumoral de ratones tratados con la vacuna NGcGM3/VSSP subcutánea no emulsiva. 2010c
157. **Ladish S.**, Kitada S., Hays EF. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest* 79: 1879-1882; 1987
158. **Lage A.**, Crombet T., Control of Advanced Cancer: The Road to Chronicity.*Int. J. Environ. Res Public Health.* 2011; 8: 683-697

159. **Lee B.**, Muhki N., Liu D. Current management and novel agents for malignant melanoma. *J Hematol Oncol* 2012; (5):356-360
160. **Lee JH.**, **Gulec SA.**, **Kyshtoobayeva A.**, **Sim MS.**, **Morton DL.** Biological factors, tumor growth kinetics, and survival after metastasectomy for pulmonary melanoma. *J Thor Cardiovasc Surg* 2009;16(10):2834-9
161. **Lee ML.**, Tomsu K. Von Eschen KB, Duration of survival for disseminated malignant melanoma. Report of meta- analysis. *Melanoma Res* 2000 (10): 81-92
162. **Leeden RW** and Yu RK: Chemistry and analysis of sialic acid. En: *Biological Role of Sialic Acid*. Rosemberg A. and Schengtrund CL (Eds.). Plenum Press, New York, 1976, pp. 1–48
163. **Levesque N.**, Mitchinson K., Lawrie D., Fedorak L., and Donald D., Normand C. et al. Health management program: factors influencing completion therapy with High dose interferon alfa 2b in patients with melanoma. *Current Oncology* 2008, 15(1) 36-41
164. **Lian B.**, LL Mao ,CL Cui, ,ZH, Chi , LSi, X.N.Sheng et al. A Phase II randomized study of high-dose interferon alfa-2b (HDI) versus chemotherapy as adjuvant therapy in patients with resected mucosal melanoma; ASCO meeting 2012 Abstract 8506
165. **Liu Y.**, McCarthy J. and Ladisch S. Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Research* 2006;66(21):10408–10414
166. **Livingston PO.** Active specific immunotherapy in the treatment of patients with cancer. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 11: 401-423, 1991
167. **Livingston PO.**, **Calves MJ.**, **Helling F.**, **Zollinger WD.**, **Blake MS.**, **Lowell GH.** GD3/proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3. *Vaccine* 1993 Sep;11(12):1199-204
168. **Livingston PO.**, Adluri S., Helling F. et al. Phase I trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet haemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine* 1994; 12(14):1275-80
169. **Livingston PO.** Augmenting the immunogenicity of carbohydrate tumor antigens. *Seminars in Cancer Biology* 1995 (6): 357-366
170. **Livingston PO.**, Zhang S., Lloyd KO. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. *Cancer Immunol Immunother*1997; 45:1-9
171. **Lloyd KO.** Tumor antigens known to be immunogenic in man. *Ann NY Acad Sci* 1993 USA 690: 50-57
172. **Lothar H.**, Finke G., Wentworth KB., Blumenstein B., Rudolph NS. , Levitsky H. et al. Peptides bound to proteosomes via hidrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *J Exp. Med* 1988; 167:658-63
173. **Lowell GH.**, Smith LF., Seid RC., Zollinger WD. Peptides bound to proteosomes via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *J Exp Med* 1988; 167:658-663
174. **Lowell GH.** Proteosomas, hydrofobic anchors, iscoms and liposomes for improved presentation of peptide and protein vaccines. En: *New Generation vaccines*. Edts: Woodrow, GC y Levine, MM, p.141, Marcel Dckker, NY 1990
175. **Lui P.**, Cashin R., Machado M. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:665-680

176. **Luiten RM.**, Kueter EW., Mooi W., Gallee MP., Rankin EM., Gerritsen WR., Clift SM., Nooigen WJ., Weder P., Van de Kastele WF., Stein J., Van der Berk PC., Nieweg OE., Berns AM., Spits H., de Gast GC. Immunogenicity, including vitiligo in metastatic melanoma patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8978-91
177. **Madorsky-Rowdo FP.**, Lacreu ML. and Mordoh J. Melanoma Vaccines and Modulation of the Immune System in the Clinical Setting: Building from New Realities. *Front Immunol* 2012; 3: 103-106
178. **Mailliard RB.**, Egawa S., Cai Q. et al . Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+Tcells: helper role of CD8+Tcells in the development of T helper type 1 responses. *J Exp Med* 2002; 195:473-483
179. **Maire C.**, Vercambre-Darras S., Devos P., D'Herbomez M., Dubucquoi S., Mortier L. Metastatic melanoma: spontaneous occurrence of auto antibodies is a good prognosis factor in a prospective cohort. *J Eur Acad Dermatol Venereo* 2011 (3):44-46
180. **Market Wire.** 24 March 2006 [cited 12 April 2007]. <http://www.marketwire.com> Canvaxin™ in patients with stage III and stage IV melanoma. Results of phase III clinical trials
181. **Malykh Y.N.**, Schauer R .and Shaw L. N-glycolyl neuraminic acid in human tumours. *Biochimie*, 2001; 83(7):623–634
182. **Marquina G.**, Waki H., Fernández LE. et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56(22): 5165–5171
183. **Marshall JA.**, Forster TH., Purdie DM., Lanagan CM., O'Connor LE., O'Rourke MG. Immunological characteristics correlating with clinical response to immunotherapy in patients with advanced metastatic melanoma *Immunol. Cell Biol* 2006; 84(3):295-302
184. **Martindale M.** The Complete Drug Reference 36<sup>th</sup> Edition Sweetman S. New York. 2009
185. **Mc Kallip R.**, Li R., Ladish S. Tumor Gangliosides Inhibit the Tumor –Specific Immune Response. *J Immunol* 1999; 163: 3718-3726
186. **Melanoma vaccines.** [http://www/medical\\_policies/melanoma](http://www/medical_policies/melanoma). Accesed June 2011.
187. **Melanoma Staging 2010.** AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition. 2010
188. **Melanoma Vaccines.** Springer Science and Business Media LLC SBM update. Last Review Status/Date. Reviewed with literature search/6:2011
189. **Merimsky O.**, Shoefeld Y., Baharav E., Zigelman R., Fishman P. Reactivity to tirosinase: expression in cancer (melanoma) and autoimmunity (vitiligo) . *Hum Antibodies Hybridomas* 1996; 7: 151-6
190. **Merimsky O.**, Shoenfeld Y., Fishman P. The clinical significance of antitirosinase antibodies in melanoma and related hypopigmentary lesions. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16: 227-36
191. **Michelsen D.** The Double Strike Hypotheses of the Vitiligo Pathomechanism: new approaches to Vitiligo and melanoma. *Medical Hypotheses* 2010; (74): 67–70
192. **Middleton M.**, Hauschild A., Thompson D. et al. Results of a multicenter randomized study to evaluate the safety and efficacy of combined immunotherapy with interleukine-2, interferon alfa 2b and histamine dihydrochloride versus Dacarbazine in patients with stage IV melanoma. *Ann Oncol* 2007;18: 1691-97

193. **Middleton MR.**, Grobb JJ., Aaronson N. Randomized Phase III study of Temozolomide versus Dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 158-166
194. **Minor DR.**, Kashani-Saber M., Garrido M. Sunitinib treatment for melanoma patients with KIT mutations. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 1457-60
195. **Miranda EP**, Gertner M. Wall J. et al. Routine imaging in asymptomatic melanoma patients with metastasis to sentinel lymph nodes rarely identifies systemic disease. *Arch Surg* 2004; 139: 831-836. Discussion 836-837
196. **Mitchell MS.** Principles of combining biomodulators with cytotoxic agents in vivo. *Semin Oncol* 1992;19:51-6
197. **Mitchell MS.**, Von Eschen KB. Phase III trial of Melacine® Melanoma Theraccine versus combination chemotherapy in the treatment of stage IV melanoma. Abstract 6445 Proc. ASCO 1997
198. **Mitchell MS.** Perspectives of melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* 1998;25: 623-626
199. **Mitjans F.** In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of  $\alpha\beta$  integrins. *Int J Cancer* 2000; 87: 716-722
200. **Molven A**, Grimstvedt MB, Steine SJ. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(1):10.
201. **Morton DL.** Foshag LJ, Hoon DS. Prolongation of Survival in Metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent vaccine. *Ann Surg* 1992; (21)68: 463-82
202. **Morton DL.**, Cochran AJ., Thompson JF. Sentinel node biopsy for early stage melanoma. Accuracy and morbidity in MSLT-1; an international multicenter trial. *Ann Surg Oncol* 2005; 2(24):302-311
203. **Morton DL.**, Mozillo N, Thompson JF. An international, randomized phase III trial of bacillus Calmette-Guerin (BCG) plus allogenic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic to regional or distant sites. *J Clin Oncol* 2007; 25(18S):8508
204. **Morton DL.**, Wen DR., Wong JH. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;(2) 127-392
205. **Mozillo N.**, Ascierto P. Reduction of regulatory T cells by intravenous High dose interferon alfa 2b treatment in melanoma patients *Pig Res* 2012 4:234-238
206. **Mulens V.**, de la Torre A, Marinello P, Rodríguez R, Cardoso J, Diaz R. et al. Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based cancer vaccine. Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. *Hum Vaccines*, 2010; 6(10): 1-9
207. **Nakarai H.**, Chandler PJ., Kano K., Morton DL., Irie RF. Hanganutziu-Deicher (HD) antigen as a possible target for immunotherapy of melanoma. *Int. Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91: 323-28
208. **NCCN Clinical guidelines in Oncology**, version 3, 2012 Melanoma
209. **NCI Common Toxicity Criteria (CTC)** version 2.0 Final 1998
210. **Nembrini C.**, Stano A., Dane KY., Ballester M., van der Vlies AJ., Marsland BJ. et al. Nanoparticle conjugation of antigen enhances cytotoxic T-cell responses in pulmonary

vaccination. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 November 1; 108(44): E989–E997. Published online 2011 October 3. doi: 10.1073/pnas.1104264108

211. **Nordlung JJ.**, Kirkwood JM., Forget BM., Milton G., Albert DM., Lerner AB. et al. Vitiligo in patients with metastatic melanoma. A good prognostic sign. *J Am Acad Dermatol* 1983;9: 689-96
212. **Nores G.**, Dohi T., Taniguchi M., Hakomori S. Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody and GM3-lactone as a possible immunogen: Requirements for tumor associated antigen and immunogen. *J Immunol* 1987; 139: 3171-3176
213. **Okeke I.**, Laber D., Bev T., McMasters K., Miller D. Temozolomide and thalidomide in the treatment of advanced melanoma, a phase II study [abstract 7573]. *J Clin Oncol* 2005; 23:728
214. **Ollila DW.**, Gleisner AL., Hsueh EC. Rationale for complete metastasectomy in patients with stage IV metastatic melanoma *J Surg Oncol* 2011;104 (4): 420-4
215. **Palermo B.**, del Bello D., Sottini A., Serana F., Ghidini C., Gualtieri N. et al. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T- cell repertoire diversity of Melan A-specific, tumor reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Res* 2010; 70(18) 7084-92
216. **Papadopoulos NE.**, Bedikilian AI., Ring S. et al: Phase I-II study of Cisplatin-Taxol-Dacarbazine regimen in metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* 2009 Jun 5 (Epub ahead of print).
217. **Parmiani G.**, Rodolfo M. and Melani C. Immunological gene therapy with ex-vivo gene modified tumor cells. A critique and a reappraisal. *Hum gene Ther* 2000; 11:1269-75
218. **Patton EE**, Widlund HR, Kutok JL., et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 2005;15(3):249
219. **Peguet-Navarro J.**, Sportouch M., Popa J., Berthier O., Schmitt D. and Pourtokalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003; 170:3488–3494
220. **Pérez DG.**, Suman VI., Fitch TR. Phase II trial of Carboplatin, weekly Paclitaxel and bi-weekly Bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma. *Cancer* 2009; (115)119-127
221. **Petrella T.**, Verma S., Spithoff K., Quirt I., McCreedy D. and the Melanoma Disease Site Group Overview Adjuvant Interferon Therapy for Patients at High Risk for Recurrent Melanoma: An Updated Systematic Review and Practice *J Clin Oncol* 2012; 413-423
222. **Petrylak D.** Defining the optimal role of immuno-therapy and chemotherapy: Advanced prostate cancer patients who receive Sipuleucel-T (PROVENGE) followed by docetaxel derive greatest survival benefit .14<sup>th</sup> Annual Meeting of the Chemotherapy Foundation Symposium; 2006 November 8<sup>th</sup> 11; New York
223. **Physician's Cancer Chemotherapy** Drug manual 2010. Jones and Bartlett Editors. New York.
224. **Polak ME.**, Borthwick NG., Gabriel FG., Jonhson P., Higgins B., Hurren J. et al. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2007 ;(12):1879-87
225. **Portoukalian J.**, Zwingelstein G., Doré J. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem* 1979; 94: 19-23,

226. **Pourtokalian J.**, Carrel S., Doré JF., Rumke P. Humoral immune response in disease free advanced melanoma patients after vaccination with melanoma-associated gangliosides: EORTC Cooperative Melanoma Group. *Int J Cancer* 1991;49:893
227. **Quaglino P.**, Marenco F., Osella-Abate S., Cappello N., Ortoncelli M., Salomone B. et al. Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol* 2010; 21(2): 409-14
228. **Ragupathi G.**, Livingston PO., Hood C., Gathuru J., Krown SE., Chapman PB, Wolchok JD, Williams LJ., Oldfield RC. and Hwu WJ. Consistent Antibody Response against Ganglioside GD2 Induced in Patients with Melanoma by a GD2 Lactone-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine plus Immunological Adjuvant QS-21. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:5214–5220
229. **Ramanathan RK.**, Lee KM., Mc Kolanis J., Hitbold E., Schraut W., Moser AJ. et al. Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Mar;54(3):254-64
230. **Ranieri E.**, Kierstead LS., Zarour H. et al. Dendritic cell/ peptide cancer vaccines: clinical responsiveness and epitope spreading. *Immunol Invest* 2000; 29: 121-5
231. **Rao RO.**, Holtan SG., Ingle JN. et al. Combination of Paclitaxel and Carboplatin as second line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2006; 106(2) 375-382
232. **Ravindranath, M.H.**, Tsuchida T., Irie RF. Diversity of ganglioside expression in human melanoma. En: *Gangliosides and Cancer*. Editado por H.F. Oettgen New York: VCH Publishers, p.79-92, 1989
233. **Ravindranath MH.**, Morton DL. Role of ganglioside in active immunotherapy with melanoma vaccine. *Int Rev Immunol* 7: 303-329, 1991
234. **Ravindranath MH.**, Kelley MC., Jones RC. et al. 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* 1998; 75(1):117-24
235. **Ravindranath MH.**, Wood TF., Soh D., González A., Muthugounder S., Pérez C. Cryosurgical ablation of liver tumors in colon cancer patients increases the serum total ganglioside level and then selectively augments antiganglioside IgM. *Cryobiolog* 2002; 45(1):10-21
236. **Ravindranath MH.**, Muthugounder S., Hannah MR., Morton DL. Significance of endogenous augmentation of antiganglioside IgM in cancer patients: potential tool for early detection and management of cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107:212-22
237. **Reiriz AB.**, Richter MF, Fernández S. et al. Phase II study of thalidomide in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 2004;14:527
238. **Restifo N.**, Dudley M., and Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 2012(12)269-281
239. **Ribas A.**, Timmerman JM., Butterfield LH., Economou JS. et al: Determinant spreading and tumor responses after peptide based cancer vaccines *Trends Immunol* 2003, 24(2):58-61

240. **Ridolfi L.**, Petrini M., Fiammenghi L., Granato AM., Ancarani V., Pancisi E. et al. Unexpected High Response Rate to Traditional Therapy after Dendritic Cell-Based Vaccine in Advanced Melanoma: Update of Clinical Outcome and Subgroup Analysis Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology 2010; Article ID504979
241. **Rietschel P.**, Chapman PB. Immunotherapy of Melanoma Hematol Oncol Clin NA 2006; 20 ©Elsevier Inc.doi:10.1016/j.hoc.2006.02.005hemonc.theclinics.com
242. **Rigel DS.**, Russak J, Friedman R. The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years beyond the ABCD. CA Cancer J Clin 2010; 60:301–316
243. **Riley LB**, **Agarwala SS** Melanoma vaccines. Expert Rev Vaccines. 2008 ;(7)937-49
244. **Robert C.**, Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C et al. Ipilimumab plus DTIC for previously untreated metastatic melanoma patients. New Engl J Med 2011; 364: 2517-26
245. **Robert C.**, Flaherty KT., Hersey P., Nathan PD., Garbe C., Milhem MM. et al. METRIC phase III study: Efficacy of trametinib (T), a potent and selective MEK inhibitor (MEKi), in progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) compared with chemotherapy (C) in patients (pts) with BRAFV600/k mutant advanced or metastatic melanoma (MM). Proceedings of ASCO Meeting 2012. Astract LBA8509
246. **Robertson GP.** Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 2005;24(2):273
247. **Rocha IM.**, Olivera LJ., de Castro LC., de Araujo Pereria LI., Cahul A., Guerra JG., Silvestre MC., Batista KM., Pereira FA., Gomide MA., Guillo LA. Recognition of melanoma cell antigens with antibodies present in sera from patients with vitiligo. Int J Dermatol 2000; 39:840-3
248. **Rodabe N.**, **Amaria K.**, **Lewis D.** and **González R.** Therapeutic options in cutaneous melanoma: latest developments. Ther Adv Med Oncol 2011; 3(5): 245–251
249. Rosai J. and Ackerman`s Surgical Pathology. Chapter 22 Melanoma 10<sup>th</sup> edition. 2011. Elsevier Inc. New York.
250. **Rosemberg SA.**, White DE. Vitiligo in patients with melanoma: normal tissues antigens can be targets for cancer immunotherapy. J Imm Emph Tumor Immunol 1996: 19:81-4
251. **Rosemberg SA.**, Yang JC., Schwartzenuber DJ. et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a sintetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. Nat Med 1998; 4:321-7
252. **Rosemberg SA.**, Yang JC., Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med. 2004;10: 909-915
253. **Rosenberg SA.**, Yang JC., Sherry, RM., Kammula US., Hughes MS. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy Clin Cancer Res. 2011; 17(13): 4550–4557
254. **Rosenthal R.**, **Viehl CT.**, **Guller U.**, **Weber WP.**, **Adamina M.**, **Spagnoli GC.** Active specific immunotherapy phase III trials for malignant melanoma: systematic analysis and critical appraisal J Am Coll Surg. 2008; 207(1):95-105

255. **Russo A E**, Torrisi E., Bevelacqua Y., Perrotta R., Libra M., McCubrey JA. et al. Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review) *Int J Oncol* 2009; 34: 1481-1489
256. **Saida T.**, Ikegawa S., Takizawa Y. and Kawachi S. Immunohistochemical detection of heterophile Hanganutziu-Deicher antigen in human malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 1990;282 (3): 179–182
257. **Samlowsky WE.**, Watson GA., Wang M. multimodality treatment of melanoma brain metastases incorporating stereotactic radiosurgery (SRS). *Cancer* 2007; 109: 1855-1862
258. **Sandinha MT.**, Farquharson MA., McKay IC., Roberts F. Monosomy 3 predicts death but not time until death in choroidal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:3497
259. **Sasse AD.**, Sasse EC., Clark LG., Ulloa L., Clark OA. Chemoimmunotherapy versus Chemotherapy for metastatic malignant melanoma. Cochrane Database Syst Rev. 2007; 24(1): 342-347
260. **Schadendorf DS.**, Ugurel., B. Schuler-Thurner. et al. Dacarbazine (DTIC ) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the De COG. *Ann of Oncol*, 2006; 17(4):563–570
261. **Schallreuter K.**, Levenig C., Berger J . Vitiligo and cutaneous melanoma. A case study. *Dermatologica* 1991; 183: 239-45
262. **Shields JA.** Treating some small melanocytic choroidal lesions without waiting for growth. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1344
263. **Shields CL, Shields JA.** Recent developments in the management of choroidal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15:244.
264. **Schlom J.** Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward. *REVIEW J Natl Cancer Inst* 2012;104:599–613
265. **Schmerling R y Buzaid C.** Manual de Oncología Clínica del Brasil. Melanoma ocular . Capítulo 43. Editores: Antonio Carlos Buzaid, Fernando Cotait Maluf, Caio M. Rocha Lima. 5ª ed. São Paulo: Dendrix Edição e Design Ltda., 2011
266. **Schreibber S.**, Kampgen E., Wagner A. et al. Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine consisting of autologous IL-2 transfected cancer cells. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:983-993
267. **Schroer- Gunther MA.**, Wolff RF., Westwood ME., Scheider FJ., Schurmann C., Baumbert BG. et al. F-18 fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography imaging in primary staging of patients with malignant melanoma. A systematic review. *Systematic review* 2012; 1:62 DOI: 10, 1186/2046-4053-1-62
268. **Schwartzentruber DJ.**, Lawson D., Richards J. A Phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100. (210 M) peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *New Engl J Med* 2011; 364: 2119-27
269. **Scursoni AM.**, Galluzzo L., Camarero S., Pozzo N., Gabri MR., Mateo de Acosta C., Vazquez AM. Detection and Characterization of N-Glycolyated Gangliosides in Wilms Tumor by Immunohistochemistry. *Pediatric and Developmental Pathology* 2010; 13, 18–23



270. **Scursoni AM.**, Galluzzo L., Camarero S., Lopez J., Lubieniecki F., Sampor C. Detection of N-Glycolyl GM3 ganglioside in neuroectodermal tumors by immunohistochemistry: an attractive vaccine target for aggressive pediatric cancer. *Pediatric and Developmental Pathology* 2011; 18: 22–27.
271. **Sennik D.** National electronic library for medicine Draft guidance from NICE does not support the use of vemurafenib in skin cancer [http://www.nelm.nhs.uk /en/NeLM-Area/News/2012](http://www.nelm.nhs.uk/en/NeLM-Area/News/2012)
272. **Serrone L.**, Zeuli M., Sega FM., Cognetti F . Dacarbazine- based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty years experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19:21-24
273. **Seyfried TN.**, Yu RK., Miyazawa N. Differential cellular enrichment of gangliosides in the mouse cerebellum: Analysis using neurological mutants. *J Neurochem.*38: 551-559, 1982
274. **Shurin G V.**, Shurin M R., Bykovskaia S., Shogan J, LotzeM T., Barksdale E M., Jr. Neuroblastoma-derived Gangliosides Inhibit Dendritic Cell Generation and Function. *Cancer Res* 2001; 61, 363–369.
275. **Sierra GVG.**, Campa HC., Varacel NM. Vaccine against group B N meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH ANN.* 1991; 14:195-210
276. **Singh AD.**, Topham A. (Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003; 110:962-965
277. **Smalley KS.**, Herlyn M. Targeting intracellular signaling pathways as a novel strategy in melanoma therapeutics. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1059:16
278. **Soengas MS.**, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22 (20): 3138
279. **Soiffer R.**, Lynch T., Mihm M. Vaccination with irradiated autologous melanoma cell engineered to secrete human granulocyte macrophage-colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma (*Proce Natl Acad Sci USA* 1998;9513:141-6
280. **Sondak VK.**, Liu PY., Tuthill RJ. Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness node negative melanoma with an allogenic tumor vaccine. Overall results of a randomized trial of the Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2058-66
281. **Soon CWM.**, Algazi A P., Cha EN., Daud AI . New Horizons in Melanoma Treatment: Targeting Molecular Pathways. *The Ochsner Journal* 2010; 10:93–98
282. **Spagnolo F.**, Queirolo P. Upcoming strategies for the treatment of metastatic melanoma. 2012 Apr; 304(3):177-84
283. **Sparano JA.**, Fisher RI., Sunderland M. et al. Randomized Phase III trial of treatment with high-dose interleukine -2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 1993;11: 1969-1977
284. **Srivastava PK.**, Udono H. Heat shock protein peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:728-732
285. **Stein WD.**, Gulley JI., Schlom J. Tumor regression and growth rates determinants in five intramural NCI prostate cancer trials.The growth rate constant as an indicator of therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(4) 2133-2139

286. **Strojan Primoz.** Role of Radiotherapy in melanoma management. Review Radiol Oncol 2010; 44(1): 1-12
287. **Stults CLM.,** Sweely CC., Macher BA. Glycosphingolipids: Structure, biological source and properties. Meth. Enzymol 1989; 179: 167-182
288. **Svenerholm L.,** Bostrom K., Freedman P., Manson JE., Rosengren B., Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. Biochim et Biophys Acta 1989; (1005):109-117
289. **Tan JK.,** Ho VC. Pooled analysis of the efficacy of the Bacile Calmette Guerin (BCG) immunotherapy in malignant melanoma. J Dermatol Surg 1993;19:985-990
290. **Tangvoranuntakul P.,** Gagneux S., Díaz S. et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic non human dietary sialic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100 (21): 12045–12050
291. **Tarhini A.** Update in Melanoma treatment. Ipilimumab. Abstract 8533. Proceedings ASCO 2012
292. **Terando AM.,** Faries MB., Morton DL. Vaccine therapy for melanoma: current status and future directions Vaccine. 2007; 27:25 Suppl 2:B4-16
293. **Testori A.,** Richards J, Whitman E et al. Phase III comparison of Vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. J Clin Oncol 2008; 26(6):955-62
294. **Therasse J.** et al. New Guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. J Natl Cancer Inst 2000; 92(3): 205-216
295. **Thomas PD.,** Brewer J. Gangliosides and synaptic transmission. Biochim. Biophys. Acta 1031: 277-283, 1990
296. **Thompson JF., Morton D.L., Kroon BBR.** Text Book of Melanoma. Chapter 29. Pag 487-492 Editors: Martin Dunitz. Taylor and Francis Group. London–New York. 2004
297. **Thompson JF.,** Swah FM. Sentinel node mapping for melanoma. Results of trials and current applications. Surg Oncol Clin N Am. 2007; 16:35-54
298. **TNM. Melanoma Staging 2010.** AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition 2010. Springer Science and Business Media LLC SBM
299. **Tsuchida T.,** Saxton RE. and Irie RF. Gangliosides of human melanoma: GM2 and tumorigenicity. J Nat Cancer Inst 1987; 78(1) 55–60
300. **Turza K.,** Denzel LT., Harris RC. et al. Effectiveness of Imiquimod to dermal melanoma metastases with simultaneous resistance of subcutaneous metastases. J Cutan Pathol 2009;13: 234-37
301. **Vázquez A.M.,** Alfonso M., Lanne B. et al. Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolyl-neuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids, Hybridoma 1995; 14 (6): 551–556
302. **Vázquez AM.,** Hernández AM., Macías A., Montero E., Gómez DE., Alonso DF., Mariano R., et al. Racotumumab, an anti-idiotypic vaccine related to N- Glycolyl- containing gangliosides. Preclinical and clinical data. Frontiers in Oncology, 2012; 10: 375- 93

303. **Verma S.**, Quirt I., Mc Ready D. Systematic review of systemic therapy for patients at high risk recurrent melanoma. *Cancer* 2006; 106:1431-1442
304. **Wagner J.** Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for melanoma staging, refining the indications. *Ann sur Oncol* 2006; 13(4): 444-446
305. **Wallack MK.**, Sivanandham M., Balch CM. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma: the final analysis of data from a phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *J Am Coll Surg* 1998; 187(1):69-77; discussion 77-9
306. **Wasif N.**, Bagaria SP., Ray P., Morton DL. Does metastasectomy improve survival in patients with stage IV melanoma? A cancer registry analysis of outcomes. *J Surg Oncol* 2011; 111-5
307. **Watarai S.**, Kushi Y., Shigeto R. Production of monoclonal antibodies directed to Hanganutziu-Deicher active gangliosides, N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Journal of Biochemistry* 1995; 117(5): 1062–1069
308. **Wheatley K.** Interferon alpha as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2007; 25: suppl abstract 8526
309. **WHO Handbook for reporting results of cancer treatment.** Geneva, Switzerland World Health Organization offset publication no.48; 1979
310. **Wiegandt, H.** The chemical structure of gangliosides. En: *Gangliosides and Cancer*. Editado por H. F. Oettgen. VCH Publishers Inc., New York. 7-15, 1989
311. **Wilgenhof S.**, Pierret L., Corthals J., Van Nuffel AM., Heirman C., Roeland T. Restoration of tumor equilibrium after immunotherapy for advanced melanoma: three illustrative cases. *Melanoma Research* 2011;21(2):152-9
312. **Wolchok JD.**, Hoos A., O'Day S. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7412-20
313. **Yajima I.**, Mayuko Y., Kumasaka MY., Thang ND., GotoY., Takeda K. et al. Review Article. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. Hindawi Publishing Corporation *Dermatology Research and Practice* Volume 2012, Article ID 354191, 5 pages
314. **Yamashita T.**, Wada R., Sasaki T. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96 (16): 9142–9147
315. **Yee C.**, Thompson JA., Roche P., Byrd DR., Lee PP., Piepkorn M. et al. Melanocyte Destruction after Antigen-specific Immunotherapy of Melanoma: Direct Evidence of T Cell-mediated Vitiligo *J. Exp. Med* 2000; 192: 1637-43
316. **Young TA, Seddon JM.** Choroidal and cutaneous melanoma: distinctly different cousins. *Ophthalmic Epidemiol* 2005; 12:221
317. **Zarour HM.**, Kirkwood JM. Melanoma vaccines: early progress and future promises. *Semin Cutan Med Surg.* 2003; 22: 68–75
318. **Zhang, C.**, Cordon-Cardo HS. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: Focus on gangliosides. *Int J Cancer*, 1997; 73(1): 42–49

319. **Zhu Yi.**, Fitzpatrick JE. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2006; 33(1):33.