

**Metodología Científica II**  
**Depto de Inmunología**  
**Facultad de Medicina - UDELAR**



# **Inmunoterapia del cáncer mediante anticuerpos que reconocen antígenos carbohidrato**

**Integrantes:**

- **Br. Cesio, Ma. Eugenia**
- **Br. Gutierrez, Ignacio**
- **Br. Rodriguez, Naibi**
- **Br. Vidal, Josué**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Osinaga**

**2014**

## INDICE DE CONTENIDOS

Carátula	1
Índice	2
Resumen	3
Justificación	4
Introducción – marco teórico	5
Cáncer	5
Sistema inmune	6
Inmunidad antitumoral	10
Respuesta antitumoral y evasión del sistema inmune	10
Anticuerpos y anticuerpos monoclonales	11
Glicoconjugados y cáncer	14
Objetivos	21
Metodología	21
Resultados	21
GD2	21
Tabla de antígenos y sus AcMo	22
O-Acetil-GD2	27
Neu5Gc	28
Lewis Y	29
Lewis X, Sialil Lewis X, Sialil Lewis A	31
Tn	32
Tf	33
Linfocito T CAR	34
Conclusiones y perspectivas	44
Referencias bibliográficas	45
Agradecimientos	55

## RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad tanto a nivel mundial como nacional. Según datos de la Comisión Honoraria de la Lucha Contra el Cáncer (CHLCC), en Uruguay constituye el 32,8% del total de las defunciones por año; por este motivo son necesarios tratamientos más efectivos y específicos contra esta enfermedad.

El cáncer es un tejido de crecimiento y desarrollo anormal, que a través de interacciones con el medio que lo rodea logra evadir el sistema inmune, el principal encargado de la vigilancia y eliminación de aquellas células potencialmente dañinas contra el organismo. En los últimos tiempos se han desarrollado terapias que intentan utilizar las características antitumorales del sistema inmune. De estos tratamientos, los que han tenido mayor éxito son los anticuerpos monoclonales (AcMo). Más de 30 han sido aprobados para uso terapéutico, mayormente contra el cáncer y desórdenes inmunitarios.

Es importante la búsqueda de nuevas dianas para los AcMo: los glicoconjugados tienen ventajas notorias, dado que en el proceso de transformación tumoral son moléculas muy frecuentemente modificadas, presentando alteraciones como pérdida de expresión, sobreexpresión, estructuras truncadas, acumulación de precursores y/o nuevas estructuras, que no están presentes en las células normales. A su vez, se sabe que estas estructuras son fundamentales para el desarrollo y progresión tumoral.

El objetivo del presente trabajo fue conocer la situación actual con respecto al tratamiento contra el cáncer mediante el uso de AcMo que reconocen antígenos carbohidrato, a través de una revisión bibliográfica. Varias investigaciones han demostrado que los AcMo dirigidos contra diversos antígenos carbohidrato (GD2, Lewis, Tn, entre otros) han demostrado ser efectivos a distintos niveles. El AcMo anti-GD2 3F8 ha sido incluso aprobado para su uso en la terapia contra el neuroblastoma. Una estructura novedosa en el tratamiento contra el cáncer son los linfocitos CAR -T; estos linfocitos han sido modificados genéticamente para expresar en su porción de reconocimiento el fragmento de un anticuerpo que le otorga la capacidad al linfocito T de reconocer estructuras glucídicas, generando potenciales ventajas terapéuticas en la mejora de la función antitumoral.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer continúa siendo un importante problema de salud. El mismo tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad en el mundo, y particularmente en nuestro país ocupa el segundo lugar como causa de muerte. Con el advenimiento de nuevas tecnologías, la terapia biológica se ha convertido en un pilar importante en el tratamiento dirigido de esta enfermedad. A la luz de las últimas investigaciones es indiscutible el rol fundamental que juega el sistema inmune en la respuesta del organismo contra el cáncer. A su vez, hay evidencia que sostiene que las células tumorales desarrollan sistemas que le permiten evadir esta respuesta, lo que aumenta su agresividad y metástasis.

Es una tarea compleja encontrar blancos moleculares que sean específicos contra las células tumorales, accesibles y efectivos tanto para el diagnóstico como para el tratamiento. En este marco, se sabe que los glicoconjugados podrían cumplir con estas características, ya que se expresan abundantemente y con modificaciones estructurales a nivel de la membrana celular de las células tumorales, a diferencia de lo que ocurre con las células normales. Por otra parte, los glicoconjugados asociados a tumores (Antígeno Carbohidrato Asociado a Tumor, TACAs por su sigla en inglés) tienen implicancias funcionales, potenciando la progresión, diseminación e invasividad del tumor (1). Sin embargo, el sistema inmune celular, el más efectivo contra el cáncer, reconoce con dificultad estas estructuras, no así la inmunidad humoral, que puede reconocerlos con facilidad pero con menos efectividad. Aún así, hoy en día existen y se utilizan una amplia variedad de AcMo como tratamiento de primera línea contra ciertos tipos de tumores, con una alta tasa de respuesta y generando un cambio impactante en la morbilidad y mortalidad de algunos de ellos, clásicamente considerados de mal pronóstico (2).

Tomando en consideración estos aspectos, el objetivo del actual trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca de los actuales avances en lo que refiere a AcMo que reconocen antígenos carbohidratos, abarcando: tipos de AcMo anti-carbohidrato que existen, en qué fase de experimentación se encuentran, su uso clínico actual o potencial. A su vez, esto permitirá formular nuevas interrogantes para impulsar nuevas investigaciones.

# INTRODUCCIÓN - MARCO TEÓRICO

## El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y su incidencia aumenta año a año. Según datos de la OMS, en 2012 fallecieron 8,2 millones de personas debido a esta enfermedad y se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. De acuerdo con la CHLCC, las muertes por cáncer constituyen aproximadamente un 23.8% del total de las defunciones registradas en Uruguay cada año (cifras del 2010). En el período 2006-2010 se han registrado 74.277 nuevos casos de tumores malignos, en el mismo período las muertes han sido 39.293 (7.859/año promedio), y lo previsto es que estos datos empeoren.(3)

Por definición, el cáncer es un tejido compuesto por distintos tipos celulares que interactúan entre sí de forma compleja; dicho tejido ha perdido la capacidad de cumplir su función original y no respeta los límites anatómicos. Esto involucra una serie de alteraciones a nivel de la señalización intra e inter celular, promoviendo la disregulación del ciclo celular y facilitando la proliferación; la emergencia de células invasoras que se disocian del tumor digieren la matriz, migran a través de la misma y de las membranas basales. A su vez, recluta células endoteliales y forma neovasos; le otorga a las células tumorales características en la superficie celular que promueve interacciones con plaquetas, leucocitos y células endoteliales facilitando la evasión del sistema inmune. Finalmente, un grupo superviviente de células invade, neovasculariza, disemina, extravasa y prolifera en una nueva localización para convertirse en metástasis. (4). Una de las características de malignidad de las células tumorales es la pérdida de la capacidad de envejecer y morir, dado por la reactivación de la actividad de la telomerasa, que permite que las células se repliquen casi indefinidamente. (5)

En la historia natural de gran parte de los tumores malignos se cumplen varios cambios moleculares, que en términos generales son comunes a la mayoría de los tipos de cáncer. Han sido descritas 10 características tumorales (6) que son importantes en la progresión del cáncer y sobre las cuáles se puede actuar a la hora de realizar un tratamiento. En la figura 1 se resumen los

principales cambios sobre los que se puede actuar en la terapia contra el cáncer. (5)

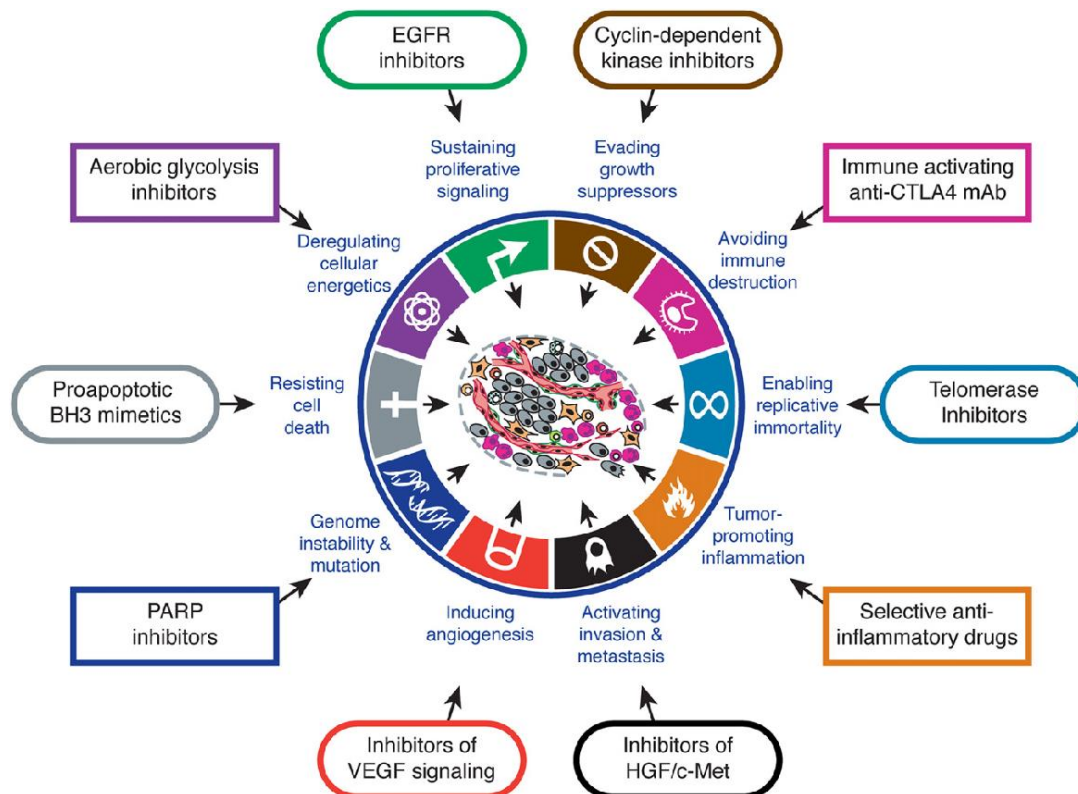
Es preciso señalar que el organismo no se encuentra indefenso contra estas mutaciones: El sistema inmunitario es su principal mecanismo de defensa. La inmunovigilancia establece que las células y tejidos son constantemente monitorizados por el sistema inmune y esto permite reconocer y eliminar la mayoría de las células tumorales y tumores incipientes. Tumores altamente inmunogénicos suelen ser eliminados en huéspedes inmunocompetentes (inmunoección) dejando las variantes menos inmunogénicas que son las que crecen y generan tumores clínicamente evidentes. (5)

Para entender cómo interactúan entre sí las células tumorales y el sistema inmune, es necesario repasar algunos conceptos generales sobre inmunidad.

### **Sistema Inmune**

Es el sistema encargado de la defensa del organismo contra cualquier agente potencialmente dañino (microorganismos, toxinas, células tumorales, etc.). Se divide clásicamente en dos ramas funcionales, una rama innata y otra adaptativa. Ambas partes se relacionan entre sí, puesto que la inmunidad innata estimula a la adaptativa y viceversa. En la tabla 1 se detallan los distintos componentes de la inmunidad innata. Aquello que los linfocitos reconocen como extraño se denomina antígeno (Ag). Las características que diferencian a la inmunidad innata de la adaptativa se resumen en la tabla 2. (7)

La inmunidad adaptativa cuenta con dos categorías principales: la inmunidad humoral y la celular. La primera está constituida por los linfocitos B, que al diferenciarse en células plasmáticas producen los anticuerpos. Estos circulan por la sangre, reconocen antígenos, los neutralizan y los marcan para su posterior eliminación. La inmunidad celular está formada por linfocitos T, quienes se encargan de la destrucción de patógenos intracelulares. Reconocen únicamente Ag peptídicos que estén unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CPH) presente en la membrana celular. En la figura 2 se resumen los principales componentes de la inmunidad adaptativa, y sus características se definen en la tabla 3. (7)



**Figura 1:** Principales dianas moleculares en el tratamiento contra el cáncer. Las drogas mencionadas son ejemplos de cada categoría, existiendo muchas más de las mencionadas. *Extraído de Hanahan, 2011, Hallmarks of Cancer: The next generation*

**Tabla 1:** Resumen de los diferentes componentes de la inmunidad innata. *Extraído de Abbas, Inmunología celular y molecular.*

Componente	Función
<i>Barreras</i>	
Capas del epitelio	Prevenir la entrada de MO
Defensinas, linfocitos intraepiteliales	Muerte de MO
<i>Células efectoras circulantes</i>	
Neutrófilos	Fagocitosis temprana, muerte de MO
Macrófagos	Fagocitosis, muerte de MO, activación de respuesta inflamatoria
Células NK	Muerte de células infectadas, activación de macrófagos
<i>Proteínas efectoras circulantes</i>	
Complemento	Muerte de MO, opsonización, activación de leucocitos
Lectinas	Opsonización, activación del complemento
Proteína C reactiva	Opsonización, activación del complemento
Factores de coagulación	Compartalización de tejidos infectados
<i>Citoquinas</i>	
TNF, IL-1, quimioquinas	Inflamación
IFN $\alpha$ y $\beta$	Resistencia a infecciones virales
IFN $\gamma$	Activación de macrófagos
IL-12, IL-18, IL-23	Producción de IFN $\gamma$ por NK y células T
IL-15	Proliferación de células NK
IL-10, TGF $\beta$	Control de la inflamación

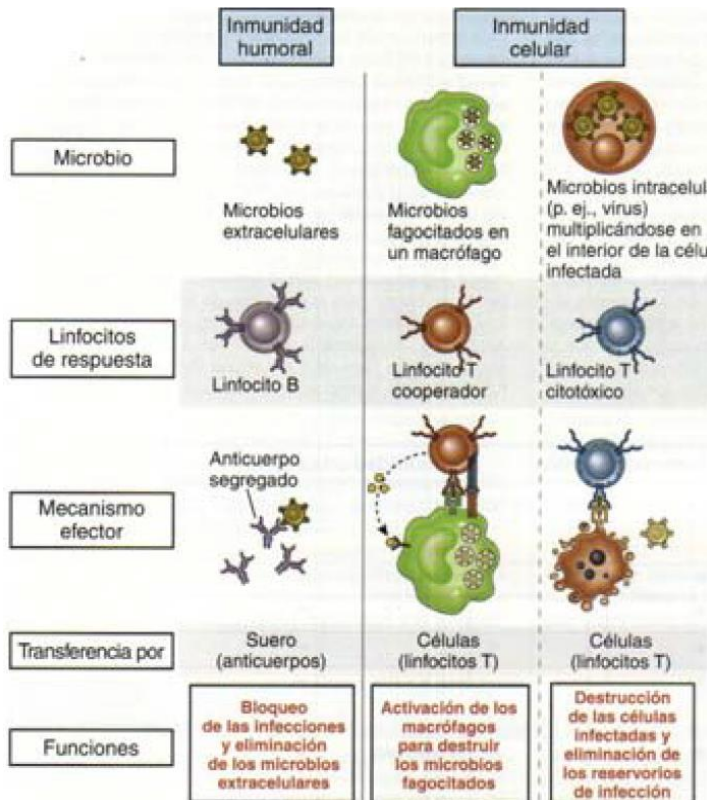
**Tabla 2:** Principales diferencias entre la inmunidad innata y adaptativa. *Extraído de Abbas, Inmunología celular y molecular*

<i>Características</i>	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Especificidad	Frente a las estructuras compartidas por grupos de MO afines	Para los antígenos microbianos o no
Diversidad	Limitada, codificada por la línea germinal	Muy amplia; los receptores se producen por la combinación somática de segmentos génicos
Memoria	Nula	Si
Autotolerancia	Si	Si
<i>Componentes</i>		
Barreras celulares y químicas	Piel, epitelios, mucosas; productos químicos antimicrobianos	Linfocitos presentes en los epitelios; anticuerpos segregados en las superficies epiteliales
Proteínas sanguíneas	Complemento, otras	Anticuerpos
Células	Fagocitos y linfocitos NK	Linfocitos

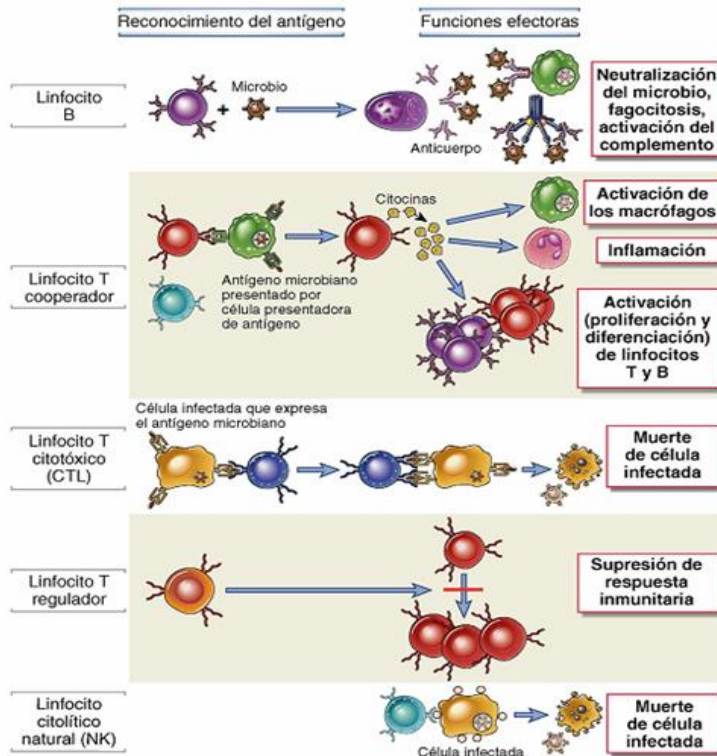
**Tabla 3:** Principales características de la inmunidad adaptativa. *Extraído de Abbas, Inmunología celular y molecular*

<i>Característica</i>	<i>Importancia funcional</i>
Especificidad	Garantiza que los distintos Ag generen respuestas específicas
Diversidad	El sistema inmune responde a una gran variedad de Ag
Memoria	Amplifica la respuesta al repetirse la exposición
Expansión clonal	Aumenta la cantidad de linfocitos específicos contra un Ag
Especialización	Genera respuestas óptimas en la defensa contra diversos tipos de MO
Contención y homeostasis	Permite que el sistema inmune responda ante el contacto con Ag nuevos
Autotolerancia	Evita la lesión del anfitrión durante la respuesta a Ag extraños





**Figura 2:** Principales componentes de la inmunidad adaptativa. *Extraído de Abbas, Inmunología celular y molecular.*



**Figura 3:** Principales clases de linfocitos. *Extraído de Abbas; Inmunología celular y molecular.*

Existen varias subpoblaciones de linfocitos, detalladas en la figura 3. La respuesta efectora de la inmunidad adaptativa puede resumirse a cuatro tipos de acciones: opsonización, fagocitosis, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad celular mediada por complemento (CDC).(7)

Las células tumorales pueden considerarse un híbrido entre las células propias, para las cuales el sistema inmunitario muestra tolerancia, y células extrañas, que el sistema reconoce como tales e intenta eliminar. Así es que surgen los conceptos de inmunidad antitumoral y evasión del sistema inmune.(7)

### **Inmunidad Antitumoral**

Los tumores expresan Ag que son reconocidos por el sistema inmune, y varios estudios ponen de manifiesto la existencia de tumores rodeados de infiltrados de células mononucleares (LT, NK y macrófagos). Las características de la respuesta son propias de la inmunidad adaptativa y está mediada principalmente por LT. Sin embargo, la respuesta inmunitaria no siempre es capaz de evitar el crecimiento del tumor pues éste suele ser inmunogénicamente débil. Además, el rápido crecimiento y diseminación superan la capacidad del sistema inmune de controlarlo. (8)

Es posible activar eficazmente al sistema inmune de forma externa para erradicar tumores, lo que ha motivado múltiples investigaciones con el fin de transformar esta característica en una herramienta terapéutica. Varias son las respuestas inmunes antitumorales potencialmente útiles como terapia. De la rama innata se destacan los NK, los macrófagos (in vitro) y los neutrófilos; de la adaptativa destacan los LT, aunque también puede existir respuesta humoral. (8)

### **Respuesta antitumoral y evasión del sistema inmune**

En el apartado de cáncer se ha explicado el concepto de inmunovigilancia e inmunoedición. Las células del sistema inmune que se infiltran se consideran un constituyente más de los tumores; estas células operan de un modo conflictivo ya que se sabe pueden antagonizar con el tumor o promover su desarrollo. La lista de células inflamatorias que promueven el crecimiento tumoral incluye subtipos de macrófagos, mastocitos y neutrófilos así como también linfocitos T y B. Estas células inflamatorias segregan TGF, VEGF,

quimioquinas y citoquinas que amplifican el estado inflamatorio, pudiendo producir factores pro-invasivos, enzimas que degradan la matriz, cisteína y proteasas. El balance entre respuestas pro y anti-tumorales resulta decisivo tanto en el pronóstico como en la búsqueda de nuevas terapias. (8)

Los mecanismos de evasión tumoral se detallan en la tabla 4

En los últimos tiempos se ha comprobado la efectividad de los tratamientos onco-específico. Una herramienta ampliamente utilizada y sobre la cuál se trabaja cada vez más son los anticuerpos monoclonales.

### **Anticuerpos y Anticuerpos Monoclonales**

Una molécula de anticuerpo (Ac) está formada por 4 cadenas peptídicas, 2 livianas y 2 pesadas, idénticas entre ellas, que se unen por puentes disulfuro. Sus funciones principales son reconocer antígenos, unirlos y llevar a cabo la respuesta efectora, la que determinará el tipo de unión a receptores y la capacidad de fijar el complemento. La porción variable de las cadenas livianas y pesadas es la que otorga la especificidad. La porción constante de las cadenas pesadas determina los distintos isotipos de inmunoglobulinas (Ig): IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En la tabla 6 se detallan las principales características de estas proteínas. (9)

Cada molécula de Ac tiene dos sitios de unión al Ag, compuestos por tres regiones variables, denominadas CDR 1,2 y 3, siendo CDR3 el más variable.

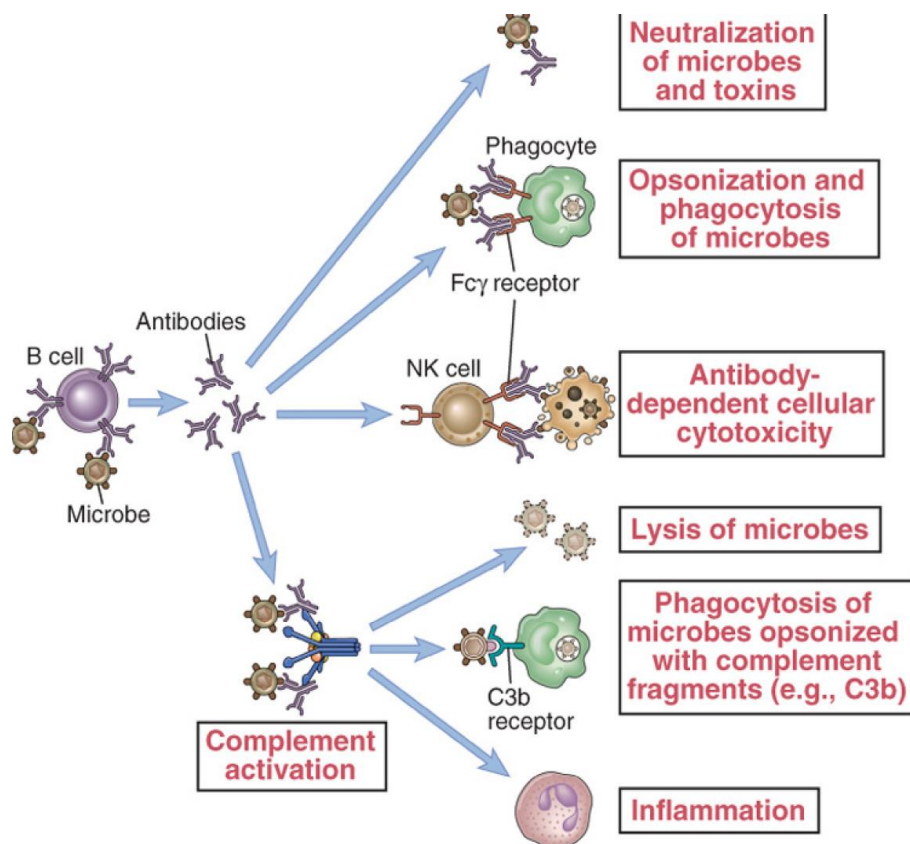
Los Ac son capaces de generar múltiples respuestas tras su unión al Ag, que depende del isotipo de Ig. Dichas respuestas se detallan en la figura 4.

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) fueron creados por Milstein y Köler, quienes fusionaron una línea celular de mieloma murino con células de bazo de un ratón inmunizado. Gracias a dicho procedimiento lograron seleccionar únicamente las células híbridas y las clonas con especificidad conocida.

El concepto que interesa destacar es el de "magic bullets", acuñado por Paul Ehrlich hace más de un siglo. Ehrlich buscó productos específicos que tuviesen afinidad únicamente por organismos patógenos, formulando de esa manera el concepto anteriormente vertido que mantiene su vigencia hoy por hoy. Su intención fue encontrar productos que actuaran sobre la causa de la enfermedad dejando indemne al huésped. Los AcMo representan dicho concepto y fueron creados para tal fin. Actualmente son utilizados tanto con fines terapéuticos como diagnósticos. (10)

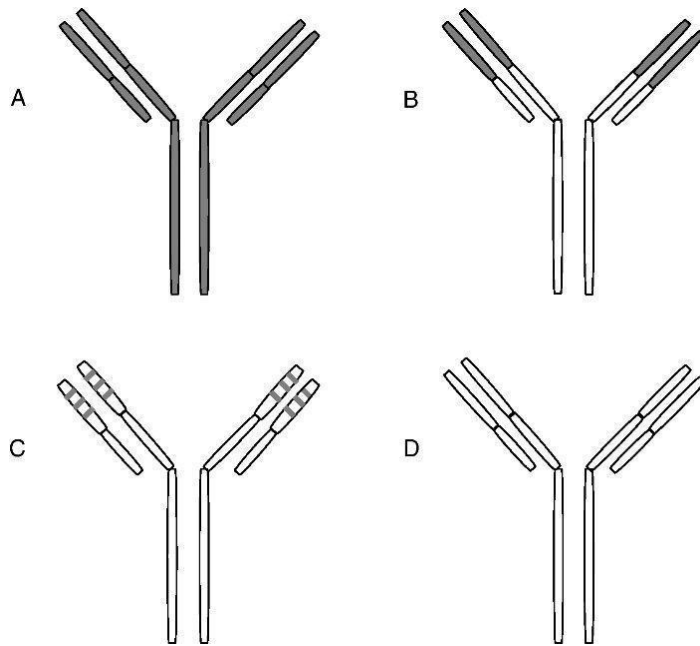
**Tabla 4:** Mecanismos de evasión tumoral (Abbas, 2013, mod)

Mecanismo evasor	
Tolerancia inmunitaria específica	
Linfocito T Regulador	Están aumentados en personas con tumores y también se encuentran en infiltrados tumorales
Pérdida de expresión antigénica	Frecuente en tumores de crecimiento rápido. Células con mutaciones que no expresan estos Ag, si no son necesarios para el crecimiento ni mantenimiento, tienen ventaja sobre las demás. Su pérdida se relaciona con mayor crecimiento y potencial metastásico
No expresión de CPH II	Las moléculas CPH de clase II son necesarias para la activación de los LT cooperadores
Productos de células tumorales inhibidores	Muchos tumores secretan TGF $\beta$ , un inhibidor de la proliferación y función efectora de LT y macrófagos. Expresión de FasL, que se une a Fas en leucocitos induciendo su apoptosis
Enmascaramiento antigénico	Las células tumorales expresan mayor cantidad de glicocaliz que las células normales



© Elsevier. Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e - www.studentconsult.com

**Figura 4:** Mecanismos efectores humorales. *Extraído de Abbas, Inmunología celular y molecular*



**Figura 5.** Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales. A) Monoclonal murino. B) Monoclonal quimérico, en el que las regiones variables son de origen murino siendo humano el resto de las cadenas. C) Monoclonal humanizado: sólo incluye los segmentos hipervariables de origen murino. D) Monoclonal humano. *Extraído de García Merino, A. Anticuerpos monoclonales, aspectos básicos. Neurología. El Sevier. Vol. 26. Núm. 05. Junio 2011*

**Tabla 5:** Inmunoglobulinas y sus principales características. *Extraída del Abbas, inmunología celular y molecular*

IgG	Monomérica	Abundante en sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmunidad pasiva del feto (cruza la placenta)</li> <li>Fija el complemento</li> <li>Opsoniza o recubre bacterias</li> <li>Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (tipo NK)</li> <li>Respuesta inmune secundaria (mayor cantidad)</li> </ul>
IgM	<u>Pentamérica</u> Unida por la proteína J	Primer isotipo formado por las células plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activa el complemento</li> <li>Respuesta inmunitaria primaria (primer isotipo)</li> </ul>
IgA	Monomérica (en sangre) Dimérica unida por la proteína J	En secreciones (lágrima, saliva, mucosas nasal e intestinal, vagina, saco conjuntival, leche)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Protección (epitelios)</li> <li>Inmunidad pasiva del lactante (leche)</li> <li>Reconocimiento de parásitos por eosinófilos (monomérica)</li> </ul>
IgD	Monomérica	Superficie de linfocitos B (SIGD)	Activación de células B en células plasmáticas
IgE	Monomérica	Superficie de basófilos y células cebadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Degranulación de basófilos y células cebadas (liberación de histamina, heparina, factores quimiotácticos de eosinófilos y neutrófilos, producción de leucotrienos)</li> <li>Hipersensibilidad inmediata</li> </ul>

La administración de anticuerpos monoclonales murinos a seres humanos generó problemas de tolerancia con producción de Ac humanos anti-murinos (HAMA) que disminuían la eficacia. (11)

Para que esto no sucediese se logró quimerizar (la región variable es murina, el resto es humano) y humanizar (sólo son murinas las regiones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas) dichos anticuerpos monoclonales. Los AcMo humanos son más ventajosos pues tienen menor antigenicidad, mejor tolerancia, mejor funcionalidad en seres humanos y mayor tiempo de circulación en relación con el resto. (Ver figura 5) (11)

Más de 30 AcMo han sido aprobados a nivel mundial para su uso terapéutico. El uso clínico de éstos está mayoritariamente limitado al tratamiento del cáncer y de los desórdenes inmunitarios. Más del 80% del mercado mundial de anticuerpos está dirigido únicamente contra cinco dianas moleculares: TNF $\alpha$ , HER2, CD20, EGFR y VEGF (ver tabla 6). Los avances tecnológicos de los últimos tiempos han permitido grandes avances entre los que se cuentan anticuerpos conjugados (ADCs), anticuerpos biespecíficos y Fc modificados mediante ingeniería genética para lograr vidas medias más largas y mejores funciones efectoras. Estos avances hacen posible la producción de Ac altamente funcionales contra virtualmente cualquier Ag o epítipo. Sus características biológicas y clínicas así como su modo de acción difieren ampliamente unos de otros. (11)

Por lo antedicho se hace necesaria la búsqueda de nuevas dianas exclusivas de cáncer. En este contexto los glicoconjugados tienen ventajas notorias, ya que su alteración puede objetivarse en la mayoría de las neoplasias.

### **Glicoconjugados y cáncer**

Todas las células y algunas macromoléculas poseen azúcares (monosacáridos y/u oligosacáridos) ya sea libres o unidos covalentemente a estructuras no glucosídicas (proteínas, lípidos) formando glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos respectivamente). Los glicoconjugados presentes en la superficie celular son característicos del tipo celular y se expresan de forma específica según la etapa de desarrollo de las células o los tejidos. Uno de los primeros cambios que sufren las células durante la transformación tumoral es la alteración en la estructura normal de estas moléculas, lo que en

**Tabla 6:** Principales dianas moleculares y los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA desarrollados contra ellas.

<i>Dianas</i>	<i>Anticuerpos aprobados</i>	<i>Principales características</i>
TNF $\alpha$	Infliximab	Potente acción antiinflamatoria; inhibe el TNF $\alpha$ e induce apoptosis de LT anormalmente activados; se usa fundamentalmente para el tratamiento de patologías autoinmunes
	Adalimumab	Inhibe el TNF $\alpha$ e induce apoptosis en LT anormalmente activados. Se usa en el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Chron
	Golimumab	Inhibidor de TNF $\alpha$ ; se usa en el tratamiento de patología autoinmune
HER2	Trastuzumab	AcMo humanizado de tipo IgG; inhibe la proliferación de células humanas tumorales que sobreexpresan HER2; posee afinidad moderada, gran acumulación tumoral y buena penetración tisular. Usado para el tratamiento de cáncer de mama, en monoterapia o tratamiento combinado
	Pertuzumab	AcMo humanizado que se usa en terapia combinada en el tratamiento del cáncer de mama que sobreexpresa HER2; inhibe la heterodimerización de HER2 dependiente de ligando; su mecanismo de acción es complementario al del trastuzumab
EGFR	Cetuximab	AcMo quimérico; inhibe señales de traducción; usado en el tratamiento de cáncer metastásico colorrectal y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en monoterapia o combinado
	Panitumumab	AcMo humanizado; mecanismo de acción similar al del cetuximab; usado en el tratamiento de cáncer metastásico de colon
CD20	Rituximab	AcMo quimérico IgG; lisis celular por sistema del complemento; usado en el tratamiento de LLC y LNH
	Tositumomab	AcMo murino radioinmunoconjugado; tratamiento de linfomas refractarios
	Ibritumomab	AcMo murino radioinmunoconjugado; primer radiofármaco aceptado por la FDA para tratamiento de linfomas
	Ofatumumab	AcMo humanizado; genera muerte mediante ADCC; se usa en el tratamiento de la LLC
VEGF	Bevacizumab	AcMo humanizado; se usa asociado a fármacos quimioterápicos en el tratamiento de múltiples cánceres metastásicos
CTLA-4	Ipilimumab	AcMo humano tipo IgG; tratamiento de melanoma avanzado irreseccable o metastásico
BLyS	Belimumab	AcMo humano tipo IgG; tratamiento de pacientes adultos con LES, con autoanticuerpos positivos y alta actividad de la enfermedad a pesar de tratamiento estándar

muchos casos favorece la progresión del tumor. Estas alteraciones incluyen: pérdida de expresión, sobreexpresión, estructuras truncadas, acumulación de precursores y/o nuevas estructuras. Las moléculas glicosiladas están caracterizadas por el tipo de unión que se forma entre la parte proteica o lipídica y el carbohidrato. Existen varios tipos de glicanos, los más comunes son los N-glicanos, cuya síntesis se inicia en el retículo endoplásmico rugoso y están formados por la unión covalente entre glicanos y proteínas. Esta unión se establece a través de un enlace N-glicosídico en el cual el azúcar se une a un residuo de asparagina (Asn) (Fig. 6-A). Los O-glicanos también son comunes, se sintetizan en el aparato de Golgi y se forman por la unión de un monosacárido, que por lo general es una N-acetilgalactosamina (GalNac), al OH de un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr) (Fig 6-B).

Otros tipos de glicoconjugados incluyen: glicosaminoglicanos, que se pueden encontrar de forma libre como el ácido hialurónico o bien formando parte de proteoglicanos como el heparán (HS) y condroitín sulfato en la matriz extracelular. Los glicoesfingolípidos, por otra parte, consisten en oligosacáridos unidos covalentemente a núcleos de ceramida y constituyen el 80% de los glicoconjugados de las células del SNC.

Los glicoconjugados presentan una enorme variabilidad y complejidad permitiéndoles estar involucrados en procesos fisiológicos esenciales como la proliferación celular, diferenciación, migración, interacción célula-célula, célula-matriz y célula-patógeno, respuesta inmune y transducción de señales (12). Por otra parte, la alteración del patrón de glicosilación se ha visto implicada en la proliferación, disociación e invasión, adhesión y metástasis de células tumorales así como también en la angiogénesis y evasión del sistema inmune (Ver figura 7) (4)

Algunos de los patrones de glicosilación alterada que se observan en las células tumorales incluyen (ver figura 8): (13)

*-El incremento de tamaño y ramificación de los N-glicanos.* Esta modificación, entre otras alteraciones, reduce la adhesión célula-célula y favorece la invasión tumoral. También provoca la pérdida de la capacidad de agruparse, reduciendo la formación de adhesiones, incrementando la movilidad a través la matriz extracelular y facilitando la invasión (14)



*-La pérdida de topografía habitual de las mucinas en las células tumorales así como la O-glicosilación incompleta por la cual se sobreexpresan antígenos Tn y T. Se ha observado que los tumores mamarios sobreexpresan MUC4, a diferencia del epitelio mamario normal. Esta molécula contiene un sector similar al EGF en su dominio extracelular, que interactúa directamente con ERBB2 iniciando la fosforilación del receptor tirosin-quinasa en ausencia de los ligandos habituales de ERBB. De esta manera, se disparan cascadas de señalización asociadas al crecimiento tumoral. La sobreexpresión de MUC4 puede también auto-fosforilar ERBB2 y contribuir a la inhibición de la apoptosis (15)*

*-Incremento en la sialización manifestada en el incremento de Ác. siálico unido a N u O-glicanos. La sobreexpresión de ácido polisialico es una alteración común en las células tumorales que se asocia con mayor invasión y peor pronóstico. Otra alteración que se observa es la expresión de Ác. siálico unido a estructuras truncadas como Ag T y Ag Tn formando los antígenos sialil T y sialil Tn respectivamente. Este último se asocia a una alteración común de muchos tumores como es la pérdida de la chaperona COSMC, necesaria en la formación de O-glicanos, y que resulta en la acumulación y mayor oferta de Ag Tn para ser sialilado. El aumento de STn se relaciona con menor interacción célula-célula y mayor potencial metastásico en carcinomas colorrectales, gástricos y ováricos (16-19)*

*- Aumento de la expresión de glicoesfingolípidos sialilados (gangliósidos) o Ác. siálicos modificados especialmente en tumores de origen neuroectodérmico. Por ejemplo, la sobreexpresión de GD3 y GM3 en los tumores de pulmón y melanoma participan en la regulación del crecimiento celular al interactuar con receptores tirosin-quinasa y PKC. Asimismo GM1 se relaciona con el crecimiento tumoral mamario al formar balsas lipídicas que permiten la interacción entre el receptor ERBB2 y ERBB3 (20)*

*- La pérdida de expresión de GPI se ha visto en algunos tipos de tumores hematopoyéticos.*

*- Cambios en la expresión de poli-N-acetilactosamina y función de galectinas.*

*-Sobreexpresión de Ác. hialurónico. Enriquece el estroma circundante, lo que: facilita el movimiento celular, participa en interacciones célula-matriz,*

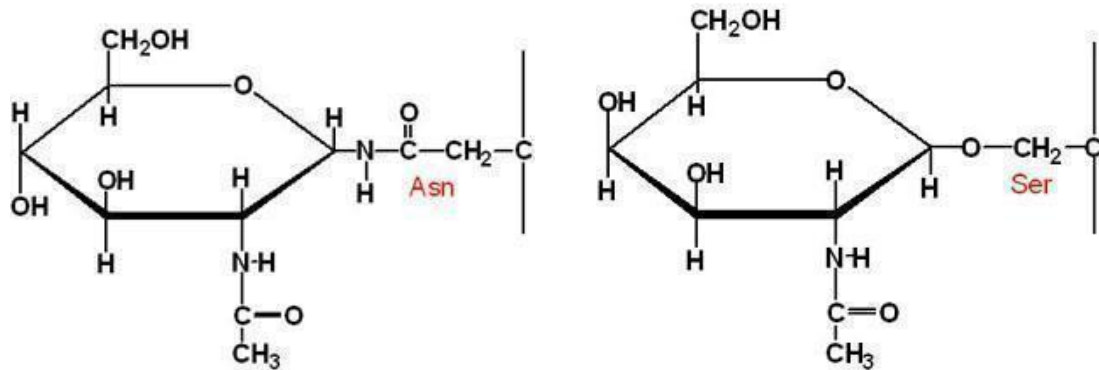
interactúa con varios receptores celulares (dentro de ellos con el CD44) y activa vías como la del fosfatidilinositol-3-quinasa/AKT y las MAP quinasa, siendo determinantes en la proliferación, supervivencia, migración e invasión celular. La interacción Ác. hialurónico-CD44 está relacionada también con la activación constitutiva de algunos oncogenes como ErbB2 (21)

- *Cambios en los glicosaminoglicanos sulfatados.* Si bien se han visto alteraciones en su estructura y distribución, solo las alteraciones del heparán sulfato se han observado en la patogénesis tumoral promoviendo interacciones célula-célula y célula-matriz (13); asimismo jugaría un rol importante en la angiogénesis tumoral al comportarse como sitio de anclaje para muchos factores pro-angiogénicos como FGF2, VEGF, PDGF y diferentes interleuquinas y quimiocinas (22)

- *Sobreexpresión de estructuras Lewis<sup>x</sup> Lewis<sup>a</sup> tanto en O-glicanos como N-glicanos y glicoesfingolípidos.* Se correlaciona con progresión tumoral, metástasis, y peor pronóstico. La pérdida de expresión del grupo AB normal (acompañado de sobreexpresión del antígeno H y estructuras Lewis Y) también se ha asociado con peor pronóstico. (13)

Aún queda mucho por saber sobre los mecanismos biológicos mediante los cuales las moléculas glicosiladas sufren alteraciones en su biosíntesis, y cómo estos cambios influyen en el comportamiento del tumor o del sistema inmune, sin embargo, no quedan dudas sobre el potencial de los mismos como blancos moleculares tanto en tratamiento, diagnóstico y monitorización de respuestas terapéuticas.

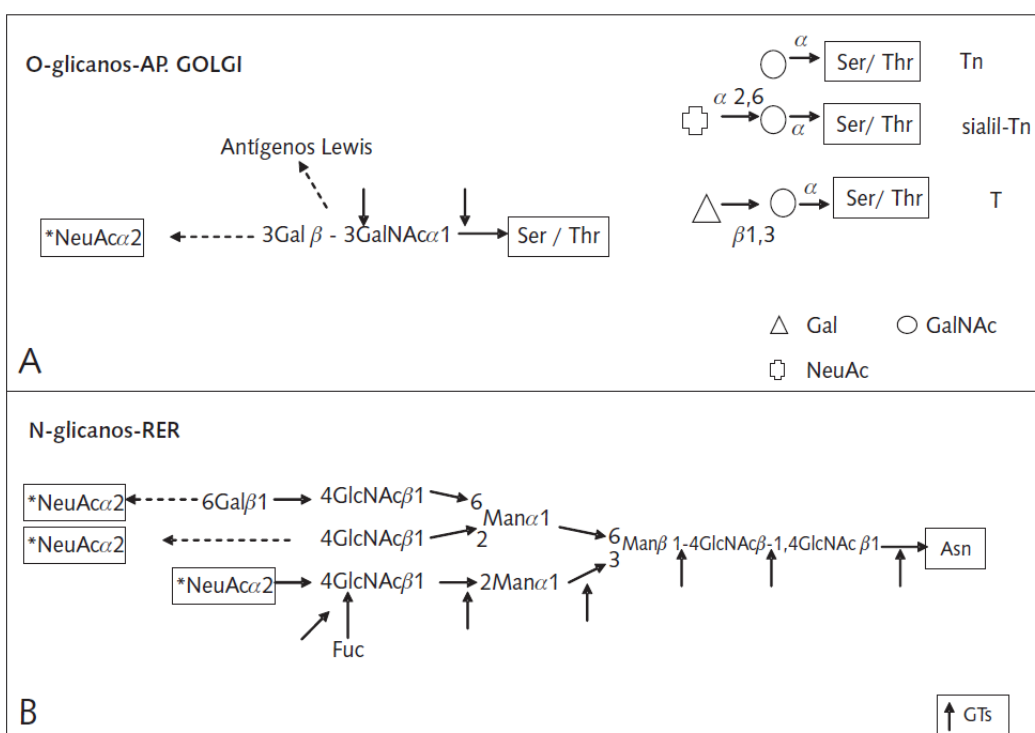
Si bien los tratamientos no específicos contra el cáncer han sido efectivos en algunos tipos de neoplasias, en términos generales los resultados son bastante desesperanzadores. Por otra parte los tratamientos onco-específicos han abierto una nueva brecha en la terapéutica contra cáncer; no obstante se hace pertinente continuar investigando y conseguir nuevas dianas para poder optimizar los tratamientos. Teniendo esto en consideración, en este trabajo presentamos el estado actual del conocimiento en lo que respecta al tratamiento contra el cáncer mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra glicoconjugados para poder visualizar cuales son los resultados obtenidos y cuales son las perspectivas a futuro en esta temática.



A - Estructura de un N-glicano.

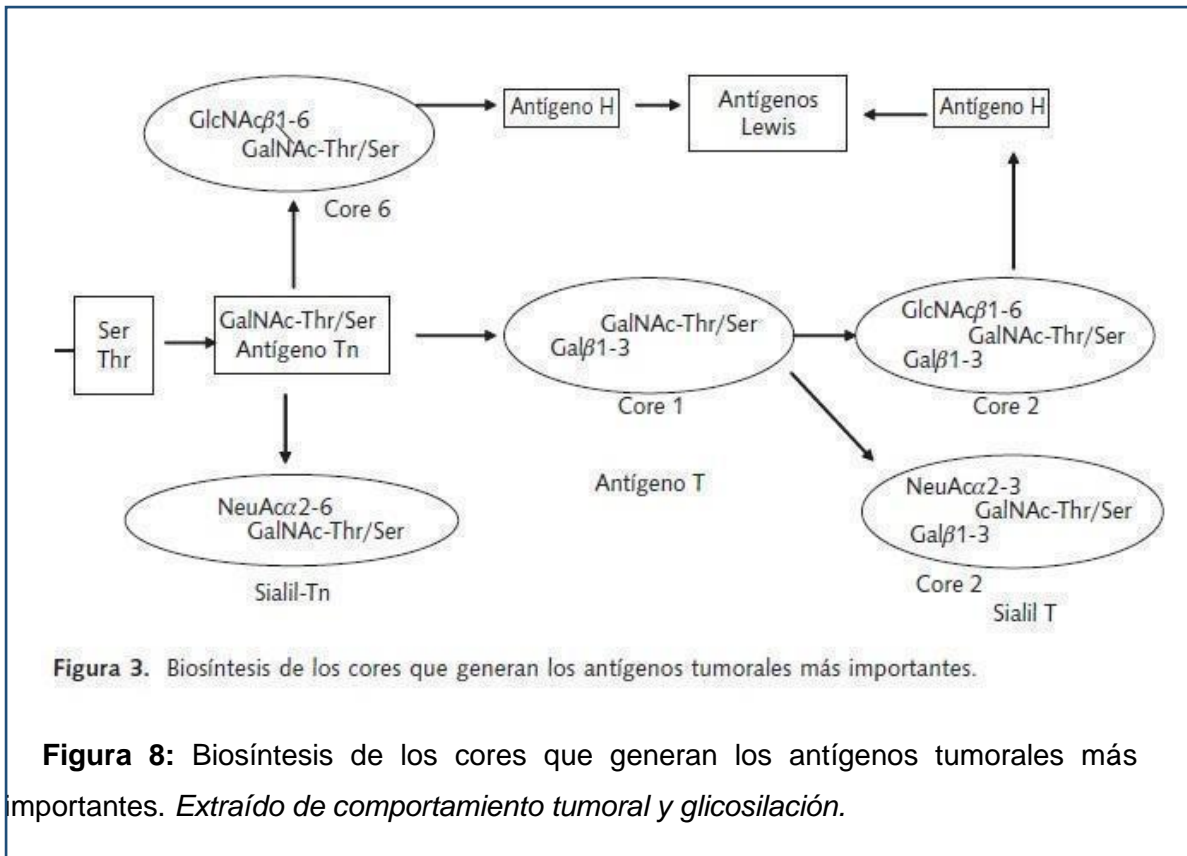
B - Estructura de un O-glicano

**Figura 6** Estructura basica de N y O glicanos (Google img).



**Figura 1.** Biosíntesis básica de los N y O-glicanos. A) Muestra los antígenos tumorales que se generan a partir de cada estructura sacarídica; B) Muestra los tipos de enlaces y ramificaciones más comunes que pueden derivarse de la estructura sacarídica en los N-glicanos. GTs se refiere a la glicosil transferasa que participa en cada etapa.

**Figura 7:** Biosíntesis básica de los N y O-glicanos. A) Muestra los antígenos tumorales que se generan a partir de cada estructura sacarídica. B) Muestra los tipos de enlaces y ramificaciones más comunes que puede derivarse de la estructura sacarídica en los N-glicanos. GTs se refiere a la glicosil transferasa que participa en cada etapa. *Extraído de Comportamiento tumoral y glicosilación.*



**Figura 3.** Biosíntesis de los cores que generan los antígenos tumorales más importantes.

**Figura 8:** Biosíntesis de los cores que generan los antígenos tumorales más importantes. *Extraído de comportamiento tumoral y glicosilación.*

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **Objetivo General**

Conocer la situación actual con respecto al tratamiento contra el cáncer mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos carbohidrato.

### **Objetivos específicos**

- Estudiar los antígenos carbohidratos que han demostrado ser relevantes como diana para el tratamiento del cáncer.
- Identificar cuales son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos carbohidrato que han demostrado tener algún tipo de actividad antitumoral.
- Conocer las generalidades de los tipos de cáncer que expresan los antígenos anteriormente mencionados.
- Investigar las perspectivas terapéuticas de dichos anticuerpos, su presente y futuro en la práctica clínica.

## **METODOLOGÍA**

El presente trabajo se realizó mediante una revisión bibliográfica. Se incluyeron los artículos sobre anticuerpos monoclonales contra antígenos carbohidratos que demostraron presentar actividad antitumoral in vitro o in vivo.

Se realizó la búsqueda en las bases de datos, Pubmed NCBI, Portal Timbó, Cochrane.

Palabras claves de la búsqueda: Monoclonal antibody, cancer, immunotherapy, glycan, carbohydrate.

## **RESULTADOS**

En la tabla 7 se muestran los anticuerpos monoclonales encontrados para antígenos carbohidratos. De éstos se desarrollarán aquellos considerados de mayor relevancia clínica.

### **ANTÍGENO GD2**

GD2 es un gangliósido altamente expresado en sarcomas y en los tumores que derivan del neuroectodermo, incluyendo el neuroblastoma, el retinoblastoma, el melanoma, el cáncer de pulmón de células pequeñas y de no células pequeñas, tumores cerebrales, osteosarcoma, rhabdomiosarcoma,

**Tabla 7: Antígenos carbohidratos y anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos en desarrollo. Principales características**

Antígeno	AcMo	Epitopo	Tipo	Naturaleza	In vivo/ vitro	Actividad	Tumor	Adversos	Fase	Ref.
<b>GD2</b>	Ch1418		IgG3	Quimerico	in vivo	ADCC	Neuroblastoma	Alodinia por toxicidad causada por activación del complemento	Aprobado por FDA	35
	14.G2a		IgG2a	Murino	in vivo	ADCC	Neuroblastoma		Fase 1	85
	c.60C3		IgG3	Quimérico	in vivo (ratas)	Regresión tumoral	Neuroblastoma		Pre-clinica	86
	3F8		IgG3	Murino	in vivo	CDC y ADCC	Neuroblastoma		Fase 1	28, 29, 30, 87, 88
	Hu1418 (14G2a versión humanizada)		IgG3	Humanizado	in vivo	ADCC	Neuroblastoma		Fase 2	90
	ME36.1		IgG3	Murino	in vitro	Lisis celular	Melanoma		-	91
<b>GD3</b>	R24		IgG3	Murino	-	ADCC y CDC	Melanoma metastasico	Urticaria	Fase 1	92
	KW-2871		IgG3	Quimérico	-	ADCC y CDC	Melanoma		Fase 2	95
	KM871		IgG3	Quimérico	-	ADCC y CDC	Melanoma		Fase 1	95
	KM8871		IgG3	Humanizado	in vitro	ADCC y CDC	Melanoma		-	95
<b>Acetil-GD2</b>	Mab 8B6/c.8B6		IgG3	Murino/ Quimérico	In vitro e in vivo	Apoptosis y detención del ciclo celular por mecanismos distintos a ADCC y CDC	Neuroblastoma	Ninguno comprobado	-	38,39, 40
<b>sialil-LewisA</b>	BR 96		IgG3	Murino y quimérico		Aumento de supervivencia y calidad de vida	CBP no células pequeñas			53
	3S193			Humanizado	In vivo (ratón)	Regresión tumoral	Cáncer de mama			47

**Tabla 7:** Antígenos carbohidratos y anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos en desarrollo. Principales características (cont.)

Antígeno	AcMo	Epitopo	Tipo	Naturaleza	In vivo/vitro	Actividad	Tumor	Adversos	Fase	Ref.
Lewis Y	SGN-15		-	Quimérico	In vivo	Mayor supervivencia	CBP a células no pequeñas	Efectos gastrointestinales (vómitos)	Fase 2	53
	MB311		IgG3	Humanizado	In vivo	CDC y ADCC	Derrame maligno (ascitis o D. pleural)	Náuseas y vómitos/Rush cutáneo	Fase 2	47, 97
LewisX	FC-2,15		IgM	Murino	In vitro	CDC	Cáncer de mama avanzado	Neutropenia	-	54
N-glicolil-neuraminico	Anti Neu 5GC		IgG	Murino	in vivo	A altas dosis inhibe crecimiento tumoral, menos infiltración de TAMS y acúmulos de NK	Cáncer de colon	A bajas dosis estimula crec. Tumoral	-	93
	14F7	NeuGcGM3	IgG1	Murino	in vivo	Actividad citotóxica	Cancer de mama y melanoma	Sin datos	-	42, 43
GM2	BIW-8962		IgG1	Humanizado	-	ADCC	Mielóma Múltiple	-	Fase 1/2	95
	KM8927		IgG3-IgG1	Humanizado	in vitro	CDC	Metástasis de CBP a células pequeñas	No mostró actividad in vivo	-	95
Sialyltetraosylceramida	SC104		IgG1	Murino	in vivo	ADCC, CDC y apoptosis	Cáncer colorrectal	-	-	95
RAAG12 Sialyltetraosylceramida	RAV12	RAGG12	IgG1	Quimérico	in vitro/vivo	Oncolisis in vitro/ actividad antitumoral in vivo	Cáncer colorrectal	Hepatotoxicidad	Fase 1	95
CA215RAAG 2	Rp215	CA215	IgG1	Murino	In vivo	CDC	Cáncer de ovario	-	-	98

**Tabla 7:** Antígenos carbohidratos y anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos en desarrollo. Principales características (cont.)

Antígeno	AcMo	Epitopo	Tipo	Naturaleza	In vivo/vitro	Actividad	Tumor	Adversos	Fase	Ref.
<b>CA215</b>	HMMC-1	Fuca1-2Galb1-4Glc-NAcb1-3Galb1-3GalNAc-Ser/Thr	IgM	Humano	In vivo	Suprime crecimiento tumoral. ADCC/CDC	Cáncer endometrio	No se encontraron datos	Experimentación	89
<b>MUC1</b>	Mab 5E5	TN-MUC1	IgG1	Murino	In vitro	ADCC	Cáncer de mama	Sin dato	-	96
<b>TF</b>	JAA-F11	$\alpha$ TF	IgG3	Murino	in vitro in vivo	Inhibe adhesión metastásica y crecimiento tumoral	Cáncer de mama, prostata y colon	Sin dato	Pre-clínica	74
<b>Tn</b>	MLS128	Tn3 y Tn2	IgG3	Murino	in vitro	Inhibe crecimiento por reducción IGF-1 receptor y EGFR	Colon y mama	No se encontraron datos	-	64
	cKM3413	Tn3 y Tn2 (de CD43)	IgG1	Humanizado	in vivo (rata)	ADCC	Linfoma T		-	66
	2154F12A4	Tn	IgM	Murino	in vivo (rata)	Inhibe adhesión al endotelio linfático	Cáncer de mama		-	65
	ChiTn / 83D4	Tn	IgG1	Quimérico/Murino	in vivo (rataón)	ADCC (asociado a ciclofosfamida)	Mama y Linfoma T		-	62
	GOD3-2C4	Tn	IgG1k	Murino	in vitro in vivo (ratón)	ADCC, inhibición de adhesión y crecimiento celular	Linfoma T, cáncer de mama, ovario, colon y pulmon		-	61



sarcoma de Edwin en niños y adolescentes, así como también liposarcoma, fibrosarcoma, leiomiomasarcoma y sarcomas de otros tejidos blandos en adultos(23-25). La glicosilación aberrante es un marcador de la transformación celular maligna. Los gangliósidos se componen de ácido siálico más glicoesfingolípidos, y juegan un papel importante tanto en la transducción de señales como en el reconocimiento y adhesión celular. GD2 es un gangliósido de tipo b, los cuales solo se expresan, en el adulto, en el sistema nervioso central y, a bajos niveles, en fibras nerviosas periféricas y melanocitos cutáneos. Es por lo anteriormente dicho que se lo ha considerado una diana adecuada para la terapia antitumoral de tipo sistémica. Los anticuerpos anti-GD2 han sido activamente utilizados en ensayos clínicos para el neuroblastoma desde hace más de dos décadas, con probada seguridad y eficacia. Las principales limitaciones han sido el dolor agudo por toxicidad debido a la presencia de GD2 en fibras nerviosas periféricas y la ineffectividad de los anticuerpos contra tumores voluminosos. Para intensificar la eficacia antitumoral, los AcMo anti-GD2 y sus fragmentos han sido modificados generando inmunocitoquinas, inmunotoxinas, drogas conjugadas a anticuerpos, anticuerpos radiomarcados, nanopartículas dirigidas, células T acopladas con anticuerpos bispecíficos y receptores antigénicos quiméricos.

Como antígeno tumoral, GD2 ha demostrado aumentar la capacidad del tumor de proliferar e invadir (26). La unión de células tumorales a anticuerpos monoclonales anti-GD2 ha demostrado interferir con la proliferación e invasividad tumoral, así como inducción directa de apoptosis (27).

Uno de los desafíos principales a la hora de crear anticuerpos terapéuticos efectivos contra tumores GD2(+) es la creación de anticuerpos con la suficiente afinidad para que puedan mediar la muerte dependiente de FcR en las células tumorales. Debido a que la respuesta inmune contra glicanos generalmente carece de cooperación de linfocitos T, los anticuerpos generados contra antígenos carbohidrato son generalmente producidos como anticuerpos IgM de baja afinidad, y a causa de su tamaño tienen grandes dificultades para penetrar en los tumores.

A pesar de estas limitaciones, varios anticuerpos anti-GD2 han sido desarrollados, y tres en particular, 3F8, ch14.18 y hu14.18, han sido extensamente probados en la clínica. Los efectos tóxicos de los anticuerpos

anti-GD2 incluyen hipertensión, dolor, fiebre y urticaria, y se piensa que está relacionado con la activación del complemento. A pesar de estos efectos colaterales, la inmunoterapia con anticuerpos anti-GD2 ha encontrado muy pocos efectos secundarios a largo plazo en pacientes que han sido seguidos durante al menos 20 años.

### **Anticuerpos monoclonales anti-GD2**

#### **- Anticuerpos murinos**

El anticuerpo 3F8 fue el primer anticuerpo anti-GD2 probado en pacientes con neuroblastoma. Es un anticuerpo IgG3 con la más alta afinidad (demostrada hasta el momento) por GD2. Este AcMo ha demostrado tener un efecto dosis dependiente y citotoxicidad mediada por complemento. 3F8 se une a FcγRII y a FcγRIII y provoca ADCC mediada por neutrófilos y células NK respectivamente; el receptor CR3 también es importante para la citotoxicidad (28,29). Al combinar 3F8 con la citoquina factor estimulante de colonia de granulocitos (GM-CSF), este anticuerpo induce en el 80% de los casos una respuesta completa en el neuroblastoma metastásico quimio resistente de médula ósea y un aumento del 60% en la supervivencia a largo plazo en niños con melanoma metastásico en estadio 4 de alto riesgo tratados en la primera remisión (29,30).

Otros dos anticuerpos anti-GD2 murinos son el ME36.1 y el 14.G2a.

14.G2a fue probado en pacientes con tumores neuroectodérmicos, provocando muchos efectos adversos (dolor, rash, fiebre), con una limitada actividad antitumoral. Cuando fue administrado con IL-2 tuvo una respuesta clínica modesta (31)

A pesar de los efectos antitumorales preclínicos de los anticuerpos anti-GD2 en modelos animales, los estudios clínicos han demostrado que cuando estos anticuerpos son administrados en humanos, la mayoría de ellos desarrolla respuestas del tipo HAMA. Para ensayos con el anticuerpo 3F8, los pacientes tuvieron un seguimiento estrecho de sus títulos HAMA y se repitió la dosis únicamente cuando la respuesta HAMA cesó. Por estas razones es que se intenta crear anticuerpos anti-GD2 que sean quiméricos, humanizados o humanos.

#### **- Anticuerpos quiméricos y humanizados**

El primer anticuerpo anti-GD2 no murino reportado fue el L72, un anticuerpo IgM humano, el cual en un ensayo clínico fue directamente inoculado en lesiones cutáneas de melanoma, viéndose una regresión del tumor en todos los pacientes, salvo en aquellos que mostraron tener una baja antigenicidad. Ningún otro estudio fue realizado. (32)

El anticuerpo 14.G2a fue quimerizado para generar la forma quimérica ch14.18 y luego la humanizada hu14.18.

Ch14.18 fue utilizado en varios ensayos clínicos fase 1 que confirmaron su seguridad siendo el dolor el efecto adverso más común. (33,34).

Un reciente estudio aleatorizado fase III demostró que ch14.18 combinado con GM-CSF, IL-2 e isotretinoína tenía una mejor supervivencia que la terapia estándar luego de 2 años de seguimiento. (35)

El AcMo hu14.18 unido a IL-2 fue probado en pacientes con melanoma en un ensayo clínico fase I, en el que se vio que la formación de anticuerpos contra la inmunocitoquina no incrementaba la toxicidad (36). En un ensayo clínico fase II respondieron un 20% de los pacientes con neuroblastoma en estadios precoces y con tumores no voluminosos (37).

El Acmo murino 3F8 también fue recientemente humanizado (Hu3F8) y ya se encuentra en ensayos clínicos fase I (clinicaltrials.gov NCT01419834, NCT01757626 y NCT01662804).

Las estrategias para mejorar las funciones de los anticuerpos anti-GD2 se resumen en la figura 9.

### **ANTÍGENO O-ACETIL-GD2**

El O-acetil-GD2 (OAcGD2) es un derivado O acetilado del disialogangliósido GD2. En un primer estudio se demostró que OAcGD2 no se expresa en los tejidos normales del organismo (incluyendo las fibras nerviosas periféricas), pero si se expresa en aquellos tumores que son GD2(+). Para este experimento se usó el AcMo 8B6, que es específico contra OAcGD2, y como control positivo se utilizó el AcMo anti-GD2 14.G2a. 8B6 es una IgG3 murina, específica contra OAcGD2, demostrándose que no tiene reacciones cruzadas con GD2 ni ningún otro gangliósido: es capaz de inhibir el crecimiento tumoral tanto in vitro como in vivo, y lo hace mediante mecanismos independientes de CDC y ADCC. Se observó que induce apoptosis y detención del ciclo celular mediante mecanismos comparables a los de 14:G2a, demostrándose entonces

que los AcMo anti-OAcGD2 son igual de efectivos que los anti-GD2 en la supresión del crecimiento tumoral. Por lo tanto, 8B6 ofrece posibilidades de tratamiento igual de efectivas que las terapias anti-GD2, sin los efectos adversos que estos provocan. (38)

En otro estudio experimental se demostró tanto in vitro como in vivo que la unión de 8B6 a las células tumorales inhibe la proliferación de tumores OAcGD2(+) mediante mecanismos de apoptosis y detención del ciclo celular, datos que concuerdan con los hallados en el anterior estudio. El efecto inhibitorio es dosis y tiempo dependiente. Quedó demostrado que existe una clara correlación entre la viabilidad de los factores inhibitorios y el número de moléculas de AcMo unidas a la superficie celular. Los datos obtenidos muestran una clara relación entre el nivel de expresión del antígeno y la especificidad del AcMo, pero no define un umbral. Por ende, la actividad proapoptótica y la detención del ciclo celular se correlacionan con los niveles de OAcGD2 que expresan las células tumorales.(39)

El tercer estudio utilizó el AcMo c.8B6, la versión quimerizada del anteriormente mencionado 8B6. Análogo a su contraparte murina, se comprobó que c.8B6 se une a OAcGD2 con una muy baja reacción cruzada con GD2, que 8B6 no presenta. En este estudio se usó como control positivo al AcMo anti-GD2 ch14.18. Ambos anticuerpos, c.8B6 y ch14.18 compiten el uno con el otro por unirse a GD2 y OAcGD2. Se vio en dicho estudio que c.8B6 parece particularmente efectivo comparado con ch14.18. El propósito del estudio fue estudiar el efecto antitumoral in vivo de ambos anticuerpos en neuroblastoma. Los estudios in vivo realizados en ratas mostraron que el tratamiento intravenoso con c.8B6 no produjo alodinia comparado con ch.14.18, incluso a dosis de 3mg/kg. (40)

### **Neu5Gc.**

Neu5Gc constituye uno de los ácidos siálicos más abundantes en los mamíferos, participando en la estabilización de moléculas y membranas, por sus cargas negativas y propiedades hidrofílicas, así como en la señalización celular mediante la interacción con el entorno extracelular. Neu5Gc tiene la particularidad de no expresarse normalmente en el ser humano. Sin embargo, Neu5Gc se expresa en diferentes patologías incluyendo determinados tipos de tumor como piel y mama. (41). La inmunización de ratones con gangliósidos

que contienen Neu5Gc, como GM3, permitió la formación del AcMo de tipo IgG1 llamado 14F7 (42). Este reconoce tumores de mama y melanoma que expresan dicho antígeno. Demostró tener actividad citotóxica en un modelo murino, por mecanismos distintos a los previamente conocidos (Apoptosis, activación de caspasas o Fas/FasL). La muerte celular inducida por 14F7 se caracterizó por edema celular, lesión de membrana y activación del citoesqueleto (43).

### **LEWIS Y (LeY)**

LeY es una oligosacárido relacionado a los antígenos de grupo sanguíneo, constituido por residuos de carbohidrato difucosilados conjugados con proteínas y lípidos, incluyendo CA-125 y MUC1. No se expresa en los eritrocitos y su expresión es independiente del estado secretor de Lewis A/B. (44-46)

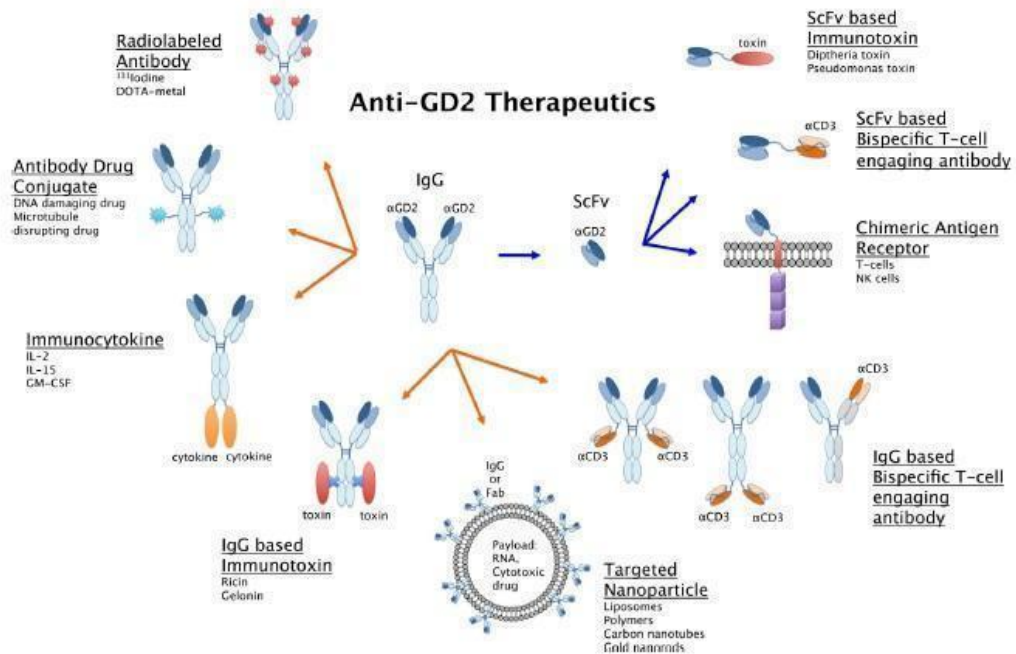
Se expresa en niveles altos en muchos tipos de neoplasias derivadas de epitelios, incluyendo ovario, colon, mama, próstata y pulmón, y a su vez tiene una baja expresión en los tejidos normales (se ha encontrado en: mucosa del esófago, estómago, intestino delgado, colon, algunas células exocrinas del páncreas, algunas células epiteliales de la vesícula biliar, el epitelio ciliado de la tráquea y bronquios y neumocitos tipo 2) en los cuales se expresa solo en su borde secretor, haciéndolo menos accesibles para los potenciales AcMo circulantes. (44-46). Su alta frecuencia, su expresión relativamente homogénea tanto en los tumores primarios como en sus metástasis y su alta densidad de expresión alterada, lo hacen atractivo como antígeno diana (47).

El gran problema de este antígeno es su alta reactividad cruzada con LeX y estructuras H-tipo 2, y la aglutinación con eritrocitos humanos, por lo que es necesario un mejor entendimiento de su expresión y de la especificidad de anticuerpos (44). Varios de los AcMo desarrollados contra LeY en los últimos estudios se encuentran unidos a radioisótopos, particularmente se han dedicado a su estudio combinado Eriksson et al., sugiriendo que su mayor potencial terapéutico está en dirigir la radioterapia, más que un tratamiento en si mismo. Es el ejemplo de BR96. (48-51).

Uno de los AcMo desarrollados contra LeY es HU3S193. En un estudio se analizó la eficacia de este anticuerpo radiomarcado con I-131 y combinado con dosis sub-terapéuticas de paclitaxel, en cáncer de mama en ratones.

**Tabla 8:** Anticuerpos monoclonales anti-GD2 actualmente en desarrollo (94)

Category	Antibody combinations	Translational status	NCT identifier
Naked antibody (3F8 based)	3F8 + allogenic NK cells	Phase I	NCT00877110
	3F8 + beta-glucan	Phase I	NCT00492167
	3F8 + heat modified 3F8 + GM-CSF	Phase I	NCT00450307
	3F8	Phase II	NCT00002458
	3F8 + GM-CSF	Phase II	NCT00072358
	3F8 + GM-CSF + beta-glucan + isotretinoin 3F8 (high dose) + GM-CSF + isotretinoin	Phase II Phase II	NCT00089258 NCT01183897, NCT01183884
Naked antibody (hu3F8 based)	hu3F8	Phase I	NCT01419834
	hu3F8 + GM-CSF	Phase I	NCT01757626
Naked antibody (ch14.18 based)	hu3F8 + IL-2	Phase I	NCT01662804
	ch14.18 + GM-CSF	Phase I	NCT01418495
	ch14.18 + lenalidomide + isotretinoin	Phase I	NCT01711554
	ch14.18/CHO + isotretinoin + IL-2 (continuous infusion)	Phase I/II	NCT01701479
	ch14.18 + GM-CSF + IL-2	Phase III	NCT00026312
Naked antibody (hu14.18 based)	ch14.18/CHO + isotretinoin + IL-2 + G-CSF	Phase III	NCT01704716
	hu14.18(K332A)	Phase I	NCT00743496
	hu14.18(K332A)+IL-2 + GM-CSF + Natural Killer Cells	Phase I	NCT01576692
	hu14.18(K332A)+IL-2 + G-CSF + GM-CSF	Phase II	NCT01857934
Naked antibody (others)	MORAb028 (human IgM)	Phase I	NCT01123304
	8B6 (anti-O-acetyl-GD2)	Pre-clinical	
Antibody cytokine fusion	hu14.18-IL2	Phase I	NCT00003750
	hu14.18-IL2	Phase I	NCT00082758
	hu14.18-IL2 + GM-CSF + isotretinoin	Phase II	NCT01334515
	c60C3-IL15	Pre-clinical	
	hu3F8-IL15	Pre-clinical	
Radiolabeled antibody	<sup>131</sup> I-3F8 + GM-CSF + bevacizumab	Phase I	NCT00450827
	<sup>131</sup> I-3F8 and <sup>125</sup> I-3F8 (intra-Ommaya)	Phase II	NCT00445965
	<sup>131</sup> I-hu3F8 and <sup>125</sup> I-hu3F8	Pre-clinical	
	hu3F8 multistep targeting	Pre-clinical	
Antibody for pre-targeting T-cell engaging bispecific antibodies	hu3F8 multistep targeting	Pre-clinical	
	hu3F8xhuOKT3 BsAb	Pre-clinical	
	hu3F8xhuOKT3 BsAb	Pre-clinical	
Chimeric antigen receptor	14G2a-CAR in EBV-CTL (1st generation)	Phase I	NCT00085930
	iC9-GD2 (14G2a) CAR transduced T cells (3rd generation CAR with iCaspase safety switch)	Phase I	NCT01822652
	iC9-GD2 (14G2a) CAR transduced VZV specific T cell + VZV vaccine	Phase I	NCT01953900
	hu3F8-CAR	Pre-clinical	



**Figura 9:** Esquema de terapéutica anti-GD2. Los formatos son predominantemente basados en el largo de las moléculas IgG o fragmentos scFv. Las plantillas IgG anti-GD2 han sido usadas para la ingeniería de anticuerpos radiomarcados, conjugados anticuerpo-droga, inmunocitoquinas, inmunotoxinas, nanoparticulas diana y células T unidas a anticuerpos bioespecíficos (flechas naranjas). Los fragmentos scFv anti-GD2 han sido usados para desarrollar inmunotoxinas, células T unidas a anticuerpos, y receptores antigénicos quiméricos para terapias con células adoptivas (flechas azules).

Se demostró que esta estrategia tuvo un efecto antitumoral significativo en el 80% de los ratones tratados, mientras que no hubo respuesta en los grupos de placebo ni control. (52). Utilizando como punto de partida este estudio, Kelly et al cambiaron I-131 por Y-90 por tener mejor penetración en el tumor, mayor diámetro de llegada y mayor vida media. Observaron que el grupo que asociaba radioterapia, paclitaxel y hu3S193 (CMRIT, combined-modality RIT) tenían regresión tumoral significativa, y todo el subgrupo llegó al final de la investigación vivo, no siendo así para los grupos tratados sólo con paclitaxel o I-131 (47)

Otro AcMo dirigido contra LeY es SGN -15. Su uso en un estudio combinado con docetaxel en pacientes con cáncer pulmonar no de células pequeñas en los cuales la quimioterapia había fallado mejoró la supervivencia (31,4 semanas contra 25,3 semanas en el grupo en que se administró solamente docetaxel) además de mejorar la posibilidad de vivir 18 meses (18% contra 8%), con pocos efectos adversos (gastrointestinales). La toxicidad parecería estar relacionada con el tamaño de la dosis (53).

### **Antígenos LEWIS X (LeX), SIALIL LEWIS X (sLeX), SIALIL LEWIS A (sLeA)**

Lewis X (LeX), CD15 o SSEA-1 es un trisacárido expresado como parte de glicoconjugados en granulocitos polimorfonucleares (PMN) y varios tumores, como cáncer de colon, carcinoma de mama, linfoma de Hodgkin y leucemia premielocítica aguda. Los glicanos que él forma y las lectinas C específicas de LeX tienen funciones adhesivas. Las células tumorales pueden interactuar con lectina C DC-SIGN en células dendríticas a través de glicanos LeX (presentes en antígenos tumorales, como CEA), llevando a supresión de las funciones de las células dendríticas. Se teoriza que la adhesión inicial de las células cancerígenas al endotelio pueden estar mediadas por un sistema E-selectina-Sialil-LeX(sLeX)-sialil LeA (sLeA). En células cancerígenas y leucocitos, sLeX es el ligando mayor para E-selectina endotelial, junto con sLeA, mediando el anclaje y rodamiento sobre las células endoteliales activadas (54). Las funciones en la adhesión de las células tumorales al endotelio, acción necesaria para la diseminación metastásica hematógica, hacen que estos glicanos (LeX, sLeX, sLeA) plantean atractivas dianas de tratamiento con

AcMo, ya que al bloquear la adhesión tumoral podría mitigarse la metástasis (54).

## ANTÍGENO Tn

La expresión del antígeno Tn es uno de los cambios fenotípicos más frecuentes que presentan las células tumorales. Desde el punto de vista estructural el Tn está conformado por la unión de un residuo de N-acetilgalactosamina a un residuo de Serina o Treonina por medio de un enlace O-glicosídico y en las células normales supone únicamente el primer paso en la O-glicosidación (ver figura 11). De esta manera, se encuentra enmascarado por el resto de los residuos glucosídicos más distales así como también permanecería oculto entre otras estructuras glicosiladas cercanas más complejas. Sin embargo, en las células tumorales donde la O-glicosilación suele ser incompleta, el mismo quedaría expuesto a ser detectado.

Tn ha demostrado su utilidad como biomarcador tumoral al ser una de las estructuras asociadas al cáncer más frecuentes y específicas, encontrándose presente en hasta un 90% de los carcinomas, siendo prácticamente indetectable en los tejidos normales (55). Asimismo su expresión y la de su derivado sialilado (sTn) ha sido asociada con mayor potencial metastásico y peor pronóstico en varios tipos de cáncer, entre ellos: mama (16;17), ovario (56), cuello uterino (57), colorectal (19), pulmón (58), gastrointestinal (18) y próstata (59).

Si bien los mecanismos moleculares a través de los cuales Tn colabora en el microambiente tumoral no son del todo conocidos, hay evidencia que lo relaciona con la adhesión, migración y metástasis de células tumorales (60) así como evasión del sistema inmune.

Debido a que la inmunización de animales y humanos con Tn ha sido capaz de generar inmunoglobulinas específicas contra Tn, el mismo podría tener utilidad en la inmunoterapia contra el cáncer. En este sentido varios AcMo han sido desarrollados y, por diferentes mecanismos, han demostrado tener actividad antitumoral:

El GOD3-2C4 (61) es un IgG1k murino específico de Tn sintéticos y Tn asociados con mucinas que reconoció linfocitos T neoplásicos y células tumorales de mama, ovario y colon. Presentó actividad ADCC contra células Jurkat in vitro y demostró limitar el crecimiento de un xenotransplante de



células tumorales pulmonares in vivo en ratones, mediante un mecanismo que estaría dado por una combinación de ADCC, inhibición de adhesión y regulación en menos de receptores y vías asociadas con el crecimiento celular (no completamente elucidado).

Chi Tn (62): es un IgG1 quimérico formado por la parte variable del AcMo Tn específico 83D4 (63) y la porción Fc de la IgG humana. Reconoce células de linfoma T humano y células mamarias tumorales de ratón. Mostró actividad dosis dependiente en asociación con ciclofosfamida in vivo en ratones con cáncer de mama, a través de un mecanismo de ADCC mediante macrófagos y neutrófilos.

MLS128 (64) es un AcMo murino de tipo IgG3, que reconoce 3 y 2 Tn consecutivos (Tn3 y Tn2) pero no Tn monovalentes. Demostró inhibir significativamente in vitro el crecimiento tumoral de cáncer de colon y mama mediante la regulación en menos del IGF-1 y EGFR sin unirse directamente a estos receptores.

2154F12A4 (65) es un IgM murino que demostró inhibir in vivo la adhesión de células tumorales mamarias al endotelio linfático.

KM3413 y cKM3413 (66): Ambos son IgG1 que reconocen Tn3 y Tn2 (del CD43), KM3413 es de origen murino y cKM3413 es la versión humanizada. Este último indujo ADCC mediada por NK y muerte celular directa in vitro. In vivo mejoró significativamente la supervivencia de ratones inoculados con células Jurkat.

### **Antígeno TF**

El antígeno TF se encuentra estrechamente relacionado con el antígeno Tn, tanto estructuralmente, ya que surge de la galactosilación de este último (ver figura 8) como también por su alta presencia y especificidad en los carcinomas (55) que incluyen mama, pulmón, colon, estómago, hígado, vejiga, ovario y próstata (67). Se asoció asimismo con peor pronóstico en cáncer de mama (68), colorectal (69), estómago (70), ovario (71) y próstata (72).

En lo que respecta a la actividad del antígeno TF en el microambiente tumoral, hay evidencia que lo coloca en un rol importante en la adhesión (72) y metástasis de células tumorales al interactuar con galectina-3 (73).

Estas propiedades pro-metastásicas se correlacionan con el bloqueo de la adhesión de células tumorales que se ha observado mediante el uso de un AcMo específico contra TF como JAA-F11.

JAA-F11 (74): Es un IgG3 murino altamente específico del antígeno TF en células tumorales por reconocer tan solo la forma  $\alpha$ -enlazada de Gal $\beta$ 1-3GalNAc. Esto es fundamental para no interactuar con linfocitos NK o células renales que expresan la forma  $\beta$ -enlazada. Asimismo demostró permanecer activo en el tumor por al menos 20 días (75).

Demostó tener actividad in vivo, en ratones con cáncer de mama, logrando prolongar la supervivencia y reducir el número de metástasis pulmonares en relación a otros ratones que no habían sido tratados con JAA-F11 (76). También se ha observado en otro modelo in vivo, en este caso de ratones con cáncer de colon, un bloqueo en la adhesión metastásica pulmonar (73). In vitro demostró inhibir la adhesión de células tumorales de mama y próstata al endotelio vascular (76).

Actualmente se encuentra en etapa preclínica para el tratamiento de cáncer de mama (77). En dicho estudio JAA-F11 reconoció 32 de 41 líneas celulares tumorales de mama independientemente de su expresión de receptores de estrógeno, progesterona y HER2. Asimismo mostró inhibir, de manera dosis dependiente, el crecimiento tumoral de las líneas celulares tumorales humanas en las que se evaluó su repuesta.

### **LINFOCITOS T CON RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO (CAR –T)**

Los linfocitos T con receptor antigénico quimérico (chimeric antigen receptor, CAR) son linfocitos modificados genéticamente, con intención terapéutica, para expresar una estructura transmembrana que tiene como porción de reconocimiento antigénico un fragmento de anticuerpo, el cual reconoce y actúa sobre el objetivo elegido sin pasar por el sistema HLA. Los CAR son derivados de un anticuerpo monoclonal combinado con la porción de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T (TCR) (78).

Los linfocitos T CAR (CAR T) tienen el potencial de madurar la expansión y la persistencia de los linfocitos T, así como aumentar la fuerza de su activación en el microambiente tumoral. Los CAR se diferencian de los TCR en varios aspectos. El primero tiene un amplio reconocimiento de estructuras, no solo proteínas, sino también carbohidratos y glicolípidos; a su vez no requiere de

presentación asociada a HLA, como si lo necesita el TCR. Sin embargo, este último puede reconocer estructuras internas de las células, mientras que el CAR requiere que sean de superficie. (79)

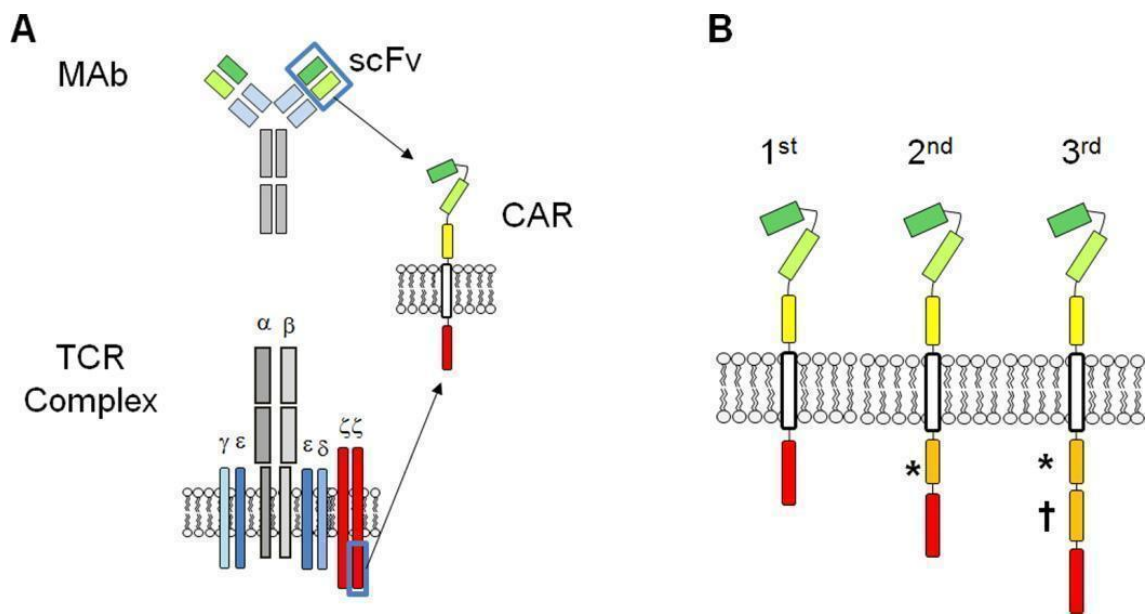
Su estructura básica consta de: un ectodominio, derivado de un fragmento variable de cadena única (scFv); una región bisagra; un dominio transmembrana; un endodominio con uno o más dominio/s señalizadores, estructura que los va clasificar en CAR-T de primera, segunda o tercera generación (uno, dos o tres endodominios, respectivamente) (Ver figura 10.A) (80).

Los endodominios son comúnmente derivados de CD3 $\zeta$  (señal 1) y moléculas coestimuladoras (Señal 2), por ej.: CD28 y 4-1BB (80)

Las reglas de elección de epítipo para CAR no están claras. Varios aspectos quedan por dilucidar, por ejemplo, no está definida la densidad antigénica requerida para la activación de CAR-T. Estos son dirigidos a antígenos altamente expresados, pero se sabe poco de los que se expresan de forma reducida. Si no fueran lo suficientemente sensibles como para reconocer antígenos en escasa densidad podría ser una limitación, pero también una ventaja si se quiere evadir antígenos con baja expresión en células normales, y alta expresión en células tumorales (79).

Las ventajas de la inmunoterapia con CAR-T radican en que: usa una de las células potencialmente más poderosas para “atacar” las neoplasias, y utiliza el sistema de reconocimiento de los anticuerpos, permitiendo reconocer estructuras diferentes a las proteínas, como los carbohidratos, combinando así dos características que fisiológicamente están separadas. Además, evita el paso intermedio por HLA, que implica escapar de algunas defensas inmunosupresoras del tumor, y también permite teóricamente usar el mismo CAR-T en situaciones diferentes (79).

Sin embargo, las primeras investigaciones (1era generación de CAR-T) fueron desilusionantes al no ser tan efectivas como lo esperado. Por eso se han agregado señales coestimuladoras (2da y 3era generaciones) que han mejorado sustancialmente los éxitos terapéuticos. (79,81)



**Figura 10: Estructura y diseño del receptor antigénico quimérico (CAR).** A) El dominio de unión antigénica extracelular del CAR es típicamente derivado de un fragmento de cadena variable simple de un anticuerpo monoclonal MAb. El segmento scFv es unido a un dominio transmembrana y un endodominio - más comúnmente el residuo de señalización del receptor de células T (TCR), cadena zeta. B) los CARs son clasificados en 1era, 2da y 3era generación dependiendo del número de endodominios coestimuladores, sumados a la estructura. Los endodominios coestimuladores más comúnmente usados en estudios clínicos y preclínicos son CD27, CD28, ICOS, 4-1BB y OX40 (Heczey & Louis, 2013)

Los receptores duales señalizadores (2da gen) en el dominio cito confieren mayor fuerza de señalización y persistencia de linfocitos T, resultando en mayor potencia global. Los CAR-T de 3era generación están formados por 2 dominios coestimuladores combinados con uno de activación en el dominio citoplasmático. Estas señales coestimuladoras pueden ser CD28, OX40, 4-1BB o coestimulador inducible de células T (ICOS). (78). La comparación entre las tres generaciones de CAR – T puede verse en la figura 10.B.

La principal preocupación de este tipo de terapia es su seguridad. Muchos de los objetivos antigénicos que se eligen para que el CAR reconozca no son completamente específicos del tumor (sobre todo en terapias dirigidas a tumores sólidos) generando el riesgo de toxicidad “on target/off tumor”, es decir, que el CAR se une correctamente a su antígeno, pero lo hace en un tejido diferente al tumoral, generando un alto riesgo de morbi-mortalidad inesperada. De hecho, se han registrado casos de muerte al usar antígenos que se creían específicos tumorales y posteriormente se demostró en las autopsias de estos pacientes que los antígenos existían en otros tejidos. (81). Actualmente se está trabajando en minimizar esta posibilidad, haciéndolo más específico, produciendo mecanismos de activación únicamente en el microambiente tumoral, o que reconozca a más de una estructura tumoral para poder activarse. (81)

Las “tormentas de citoquinas” son otro problema de seguridad. Están asociadas a intensas respuestas anti-tumorales mediadas por grandes números de células T activadas. Esto causa fiebre e hipotensión, pudiendo ocasionar falla orgánica múltiple. Esta toxicidad es peligrosa ya que no puede controlarse reduciendo la dosis de la droga, pues los LT proliferantes aumentarán en número y eventualmente llegaran a niveles críticos donde la respuesta de citoquinas sincronizadas excederá la tolerancia del organismo. (79)

Otra dificultad que plantean los CAR-T ya mencionada es que requiere la expresión de su diana en la membrana de las células tumorales.

Como se mencionó previamente, esta estructura permite dirigir a los LT modificados contra estructuras que los linfocitos T fisiológicos normalmente no reconocen, como los glicanos. En el tabla 9 podemos observar aquellos CAR

que han sido desarrollados, y están resaltados los que se dirigen contra carbohidratos.

### **CAR-T dirigido contra GD2 – ejemplo de un CAR-T dirigido contra un glicano**

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en niños, y la tercera causa de muerte por cáncer pediátrico. Es un objetivo interesante para la inmunoterapia por su expresión de antígenos poco detectados en tejidos normales, como la molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), GD2, B7H3 y O-acetil GD2. Clínicamente, como ha sido mencionado anteriormente, los AcMo dirigidos contra GD2 mejoran el tiempo libre de enfermedad y supervivencia global. Sin embargo, los efectos antitumorales están limitados por la biodistribución pasiva del AcMo, su vida media y su dependencia de mecanismos efectores para destruir células tumorales. (78)

Se investigó el uso de CAR-T con reconocimiento de GD2. Uno de los estudios más largos en este tema utilizó la porción scFv extraído del AcMo 14g2a. Pule et al modificaron genéticamente LT CTL específicos de virus Epstein Barr (EBV) para que expresaran CARs dirigidos contra GD2. (82) Se eligieron estos LT en particular teorizando que los receptores nativos de estas células actuarían como coestimulación activa: Proporcionarían acople a células presentadoras de antígeno profesionales. (83) En esta investigación se demostró que sobrevivieron más que los LT activados por Ac OkT3 específicos para CD3, los que expresaban el mismo CAR pero sin especificidad para el virus. Cabe destacar que un criterio de elección de los pacientes era ser seropositivo para EBV (84). La infusión fue asociada con regresión tumoral o necrosis en la mitad de los sujetos evaluados. Demostraron también que los GD2-CAR-CTL circulaban en niveles más altos que GD2-CAR-ATC enseguida después de la dosis, pero ambos se encontraban en niveles bajos o indetectables a las 6 semanas. (83)

El mismo grupo continuó evaluando su población tratada a largo plazo, más nuevos casos que incluyeron, por 4 años. Observaron que si bien a las 6 semanas los niveles de CAR-T eran bajos, estos no seguían descendiendo, pudiéndose encontrar circulando en sangre a las 192 semanas para los CAR-ATC y 96 para los CTL. La duración fue altamente concordante con los niveles de CD4+ y de células de memoria centrales (contabilizados previo a la

infusión). Se cree que los CAR-T pueden haberse extendido y persistido en bajos niveles, lo que fue asociado a mejor supervivencia. (83)

Las ventajas potenciales del GD2-CAR-T sobre los AcMo contra GD2 serían:

- Moléculas multivalentes en la superficie de linfocitos T producirían un agente con mayor avidéz global que el Ac en su forma bivalente, llevando a una unión aumentada con células malignas en las cuales la expresión antigénica era demasiado baja para provocar la unión de Ac. Soluble.(83)
- Los mecanismos efectores citotóxicos usados para linfocitos T podrían matar células tumorales más fácilmente que los reclutados por Ac. Solos.(83)
- El potencial de los CAR-T de permanecer en sangre por más tiempo que los Ac podría llevar a un control superior a largo plazo de las recaídas.(83)

Los efectos adversos encontrados en este caso particular fueron fiebre de bajo grado y dolor local leve a moderado en el sitio de necrosis del tumor, y dolor local inexplicable. Ninguno de los pacientes desarrolló en 4 años los dolores neurológicos asociados al tratamiento con AcMo contra GD2 (dolor atribuido a la cascada de complemento por componente Fc, componente que no se encuentra en este CAR). (83)

**Tabla 9:** CAR-T Desarrollados en ensayos pre-clínicos y clínicos (extraído de Anurathapan, 2014)

Hematologic malignancies		CAR construct						Pre-clinical data	Clinical data
Target antigen	Exo-domain (clone)	Hinge	Transmembrane	Endo-domain 1	Endo-domain 2	Endo-domain 3			
CD19	scFv (FMC63)	CH2CH3	CD4	CD3ζ	-	-	+	+	
	scFv (FMC63)	FcRγ	FcRγ	CD3ζ	-	-	+	-	
	scFv (FMC63)	CD8α	CD8	CD3ζ	-	-	+	-	
	scFv (FMC63)	CH2CH3	CD28	CD3ζ	-	-	+	+	
	scFv (SJ25C1)	CD8α	CD8	CD3ζ	-	-	+	-	
	scFv (FMC63)	CD28	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	+	
	scFv (FMC63)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	+	
	scFv (FMC63)	CD8α	CD8	41BB	CD3ζ	-	+	+	
	scFv (FMC63)	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (SJ25C1)	CD28	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	+	
	scFv (FMC63)	CD8	CD8	CD28	41BB	CD3ζ	+	-	
	CD19	scFv (FMC63)	CD8α	CD28	CD28	41BB	CD3ζ	+	-
	CD20	scFv (Leu16)	CH2CH3	CD4	CD3ζ	-	-	+	+
scFv (Leu16)		CH2CH3	CD4	CD28	CD3ζ	-	+	-	
scFv (Leu16)		CH2CH3	CD4	CD28	CD137	CD3ζ	+	+	
CD22	scFv (M791)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (HA22)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (BL22)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (HA22SH)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (HA22SH)	CH2CH3	CD8	41BB	CD3ζ	-	+	-	
	scFv (M791)	CH2CH3	CD8	CD28	41BB	CD3ζ	+	-	
	scFv (HA22)	CH2CH3	CD8	CD28	41BB	CD3ζ	+	-	
	scFv (BL22)	CH2CH3	CD8	CD28	41BB	CD3ζ	+	-	
	scFv (HA22SH)	CH2CH3	CD8	CD28	41BB	CD3ζ	+	-	
	CD30	scFv (HRS3)	CH2CH3	FcεR1γ	CD3ζ	-	-	+	-
scFv (HRS3)		CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
Kappa	scFv (CRL1785)	CH2CH3	CD28	CD3ζ	-	-	+	-	
	scFv (CRL1785)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-	
CD70	CD27	CD27	CD27	CD3ζ	-	-	+	-	
CD123	scFv(7G3)	CH2CH3	CD28	CD3ζ	-	-	+	-	
NKG2D	mNKG2D	mNKG2D	mNKG2D	CD3ζ	-	-	+	-	
Solid tumors		CAR construct						Pre-clinical data	Clinical data
Target antigen	Exo-domain (clone)	Hinge	Transmembrane	Endo-domain 1	Endo-domain 2	Endo-domain 3			
GD2	scFv (14.G2a)	CH2CH3	FcεR1γ	CD3ζ	-	-	+	-	
GD2	scFv (7A4)	CH2CH3	FcεR1γ	CD3ζ	-	-	+	-	
	scFv (14.G2a)	CH2CH3	CD3	CD3ζ	-	-	+	+	



**Tabla 9:** CAR-T Desarrollados en ensayos pre-clínicos y clínicos, extraído de Anurathapan, 2014 (Cont)

Solid tumors	CAR construct						Pre-clinical data	Clinical data	
	Target antigen	Exo-domain (clone)	Hinge	Transmembrane	Endo-domain 1	Endo-domain 2			Endo-domain 3
HER2	scFv (NY29)	NA	NA	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (NY29)	CD28	FcR1 $\gamma$	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (FRP5)	CH2CH3	Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (4D5)	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (4D5)	CD8	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (ICR12)	CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (FRP5)	NA	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (FRP5)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (FRP5)	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (4D5)	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (4D5)	CD8	CD8	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	HER2	scFv (4D5)	CD8	CD8	41BB	CD3 $\zeta$	-	+	-
		scFv (ICR12)	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
scFv (4D5)		CD28	CD28	CD28	41BB	CD3 $\zeta$	+	-	
scFv (4D5)		CD28	CD28	CD3 $\zeta$	CD28	41BB	+	-	
scFv (4D5)		CD8 $\alpha$	CD8	41BB	CD28	CD3 $\zeta$	+	-	
scFv (4D5)		CD8 $\alpha$	CD8	41BB	41BB	CD3 $\zeta$	+	+	
scFv (4D5)		CD8 $\alpha$	CD8	41BB	CD3 $\zeta$	CD28	+	-	
FBP	scFv (MOv18)	NA	NA	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (MOv18)	NA	FcR $\gamma$	CD3 $\zeta$	-	-	+	+	
CD171	scFv (CE7)	Fc	CD4	CD3 $\zeta$	-	-	+	+	
CAIX	scFv (G250)	NA	Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (G250)	CH2CH3	CD4	CD3 $\zeta$	-	-	-	+	
PSMA	scFv (J591)	CD8	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
PSMA	scFv (J591)	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
IL13-zetakine	scFv (E13Y)	Fc $\gamma$ 4	CD4	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (E13Y)	N/A	CD3	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (E13Y)	CD8	CD3	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
EphA2	scFv (4H5)	CH2CH3	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
FAP	scFv (MO36)	Ch2CH3	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
KDR	scFv (P3S5)	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (mVEGFR-164)	cMyc-CD8	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (mDC101)	CD8	CD8	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (KDR-1121)	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
	scFv (mDC101)	CD8	CD8	CD28	41BB	CD3 $\zeta$	+	-	
	scFv (mSP6)	CD8	CD8	CD28	41BB	CD3 $\zeta$	+	-	
	scFv (KDR-1121)	CD28	CD28	CD28	41BB	CD3 $\zeta$	+	-	
VEGFR-1	scFv (V-1)	CH2CH3	CD4	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	

**Tabla 9:** CAR-T Desarrollados en ensayos pre-clínicos y clínicos, extraído de Anurathapan, 2014 (Cont)

Solid tumors	CAR construct						Pre-clinical data	Clinical data
	Target antigen	Exo-domain (clone)	Hinge	Transmembrane	Endo-domain 1	Endo-domain 2		
EGFRvIII	scFv (3C10)	CD8	CD8	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (mab139)	CD8α	CD8	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (mab108)	FcIgG2	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (mab139)	CD8α	CD8	ICOS	CD3ζ	-	+	-
Mesothelin	scFv (SS1)	CD8α	CD8	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (P4)	CD8α	CD8	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (SS1)	CD8α	CD8	41BB	CD3ζ	-	+	-
	scFv (SS1)	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (P4)	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (SS1)	CD8α	CD28	CD28	41BB	CD3ζ	+	-
	scFv (SS1)	CD8α	CD28	CD28	41BB	CD3ζ	+	-
CD44 v6/v7	scFv (1.1ASML)	CD8α	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (VFF17)	cMyc-CD8α	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
TAG72	scFv (B72.3)	NA	NA	FCεR1γ	-	-	+	-
	scFv (CC49)	CH2CH3	CH2CH3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (CC49)	Fc1γ-CH3	CD4	CD3ζ	-	-	+	-
Lewis-Y	scFv (Mluc1)	NA	NA	FcRγ	-	-	+	-
	scFv (Hu3S193)	CD8	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
MUC1	scFv (SM3)	CD28	CD28	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (SM3/HMFG2)	CH2CH3	CD28	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (SM3)	IgD-CD28	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (SM3/HMFG2)	FcIgG1	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (HMFG2)	FcIgG1	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (HMFG2)	FcIgG1	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
	scFv (HMFG2)	IgD-FcIgG1	CD28	CD28	OX40	CD3ζ	+	-
	scFv (HMFG2)	FcIgG1	CD28	CD28	41BB	CD3ζ	+	-
FAR	scFv (Fab35)	FcIgG1	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (Fab35)	FcIgG1	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-
NCAM	scFv (D29)	CD3	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
CEA	scFv (MFE23,22)	CD3	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (MD45)	CD8	FCγR	FCγR	-	-	+	-
	scFv (pUC19)	CD8	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (BW431/26)	FcIgG1	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (MFE23)	CD8α	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (A3B3)	CD8α	NA	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (pUC19)	CD8	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (C2-45)	CD8α	CD3	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (SCA431)	Fc	CD4	CD3ζ	-	-	+	-
	scFv (MFE23,22)	CD28	CD28	CD28	CD3ζ	-	+	-

**Tabla 9:** CAR-T Desarrollados en ensayos pre-clínicos y clínicos, extraído de Anurathapan, 2014 (Cont)

Solid tumors	CAR construct						Pre-clinical data	Clinical data	
	Target antigen	Exo-domain (clone)	Hinge	Transmembrane	Endo-domain 1	Endo-domain 2			Endo-domain 3
CEA	scFv (BW431/26)	FcIgG1	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
	scFv (MFE23)	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
	scFv (F11-39)	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
	scFv (C2-45)	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
	scFv (pUC19)	CD8-CD28	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
	scFv (SCA431)	Fc	CD4	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-
EGP2	scFv (GA733.2)	CD8 $\alpha$	FcR $\gamma$	FcR $\gamma$	CD3 $\zeta$	-	+	-	
EGP40	scFv (BR3E4/FG1)	NA	NA	FcR $\gamma$	-	-	+	-	
ERBB3/4	scFv (C11)	cMyc-CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (FRP5)	cMyc-CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (RAK)	cMyc-CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (heregulin $\beta$ 1)	cMyc-CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (hrg $\alpha$ )	CH2CH3	CD34	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
ERBB3/4	scFv (hrg $\beta$ )	CH2CH3	CD34	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
ErbB	scFv (T1E)	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
GD-3	scFv (MB3.6)	CD8 $\alpha$	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (MB3.6)	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	
PSCA	scFv (7F5)	$\beta$ C2	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (hu1G8)	CH2CH3	CD28	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (hu1G8)	CD8 $\alpha$	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (7F5)	CD8 $\alpha$	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (MB1)	CD8 $\alpha$	CD8	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
HLA-A1+MAGE1	scFv (MZ2-82/30)	FcIgG1-CD3	CD3	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	scFv (G8)	NA	CD4	Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	-	-	+	-	
	scFv (G8)	CD28	CD28	Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	-	-	+	-	
	scFv (Hyb3)	CD28	CD28	Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	-	-	+	-	
NKG2D	mNKG2D	mNKG2D	mNKG2D	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
NKG2D	hNKG2D	hNKG2D	hNKG2D	CD3 $\zeta$	-	-	+	-	
	hNKG2D	FcIgG1	CD28	CD28	CD3 $\zeta$	-	+	-	

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los grandes avances tecnológicos han permitido que conceptos sobre inmunoterapia, que antiguamente sólo se encontraban en la teoría, sean hoy en día una realidad. Esto ha llevado a formular nuevas hipótesis, abriendo nuevos horizontes en este campo.

Existe evidencia que apoya la utilidad de los AcMo dirigidos hacia antígenos carbohidrato en el tratamiento contra el cáncer. Asimismo, gran parte de las neoplasias que provocan la mayor tasa de mortalidad (con peor pronóstico y alta tasa de metástasis) expresan este tipo de antígenos. En efecto, GD2 ha demostrado ser tratamiento de primera línea en algunos tipos de neuroblastoma.

Aún no se conocen completamente los mecanismos moleculares subyacentes que provocan las alteraciones en la glicosilación, ni como los glicoconjugados alterados influyen sobre el microambiente tumoral. Sin embargo, gran parte del nuevo conocimiento que se tiene al respecto ha sido alcanzado gracias al desarrollo de nuevos AcMo dirigidos contra glicoconjugados. A su vez, en este proceso de búsqueda, se descubren día a día nuevos epítomos carbohidratos pasibles de ser blancos de nuevos AcMo con mejores perfiles de acción y seguridad.

Si bien los carbohidratos tienen un gran potencial, ocasionalmente los AcMo dirigidos contra ellos tienen reacciones cruzadas con estructuras similares expresadas en los tejidos humanos normales, generando la necesidad de mejorarlos y desarrollarlos con perfiles de mayor especificidad y menor toxicidad.

Con el objetivo de conseguir una mejor respuesta antigénica se ha diseñado una nueva estructura, los linfocitos CAR-T, mediante ingeniería genética, una estrategia prometedora en el tratamiento contra el cáncer.

Por último, importa destacar que además de contar con varios AcMo con probada actividad antitumoral, también existen otros que tienen funciones como marcadores diagnósticos, pronósticos y de control evolutivo, los cuales se están estudiando para transformarlos en AcMo terapéuticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Freire T, Osinaga E. The sweet side of tumor immunotherapy. *Immunotherapy*. 2012 Jul; 4(7):719-34. doi: 10.2217/imt.12.58.
- 2- Andrew M. Scott, Jedd D. Wolchok & Lloyd J. Old. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 278-287 (April 2012) doi:10.1038/nrc3236
- 3- Comisión honoraria de lucha contra el cáncer, R. N. de C. (2014). Resumen de la situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer Mayo 2014.
- 4- Mark, M. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature*, 526-542.
- 5- Stricker T, Kumar V. Neoplasias. En Robbins LS, Cotran SR. *Patología estructural y funcional*. 8va ed. España: Ed. Elsevier; 2010. p. 258-330
- 6- Hanahan, D., Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cáncer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74. Doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- 7- Abbas, K., Lichtman, A., & Pillai, S. (2013). *Inmunología celular y molecular* (6 ed.). Elsevier.
- 8- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- 9- A. García Merino. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 2011;26(5):301—306.
- 10- Carsten Riether, Christian Schürch, Adrian F. Ochsenbein. From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13734.
- 11- Hyunbo Shim. One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, Vol. 43, No. 10, 539-549, October 2011.
- 12- Ohtsubo K, Marth JD Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126:855-86 (2006)
- 13- Varki, A. (2009). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New.
- 14- Guo HB, L. I. (2002). Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res*, 62(23):6837-45.

- 15- Komatsu M1, J. S. (2001 Jan 25). Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene* , 20(4):461-70
- 16- Cazet, A. (2010). Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research*.
- 17- Brooks, S. (2001). GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. *Cancer Research Campaign*, 1014-1022.
- 18- Eugenyi, S. (2013). The Relation of the Level of Serum Anti-TF, -Tn and -Alpha-Gal IgG to survival in Gastrointestinal Cancer Patients. *International Journal of Medical Sciences*.
- 19- Konno, A. (2002). Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis*, 61-70.
- 20- Nagy, P. e. (2002). Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *Cell Sci*.
- 21- Ghatak, S., Misra, S., & Toole, B. (2005). Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* , 8875-8883.
- 22- Iozzo RV, S. A. (2001 Aug). Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*, 108(3):349-55.
- 23- Cheung, N.K., Saarinen, U.M., Neely, J.E., Landmeier, B., Donovan, D. and Coccia, P.F. (1985) Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 45, 2642–2649.
- 24- Chang, H.R., Cordon-Cardo, C., Houghton, A.N., Cheung, N.K. and Brennan, M.F.(1992) Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer* 70, 633–638.
- 25- Grant, S.C., Kostakoglu, L., Kris, M.G., Yeh, S.D., Larson, S.M., Finn, R.D., Murray JL, Cunningham JE, Brewer H et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J. Clin. Oncol.* 12(1), 184–193 (1994).
- 26- Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H, Sato S, Ueda R, Furukawa K. GangliosideG(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell

- proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* 61(10), 4244–4252 (2001).
- 27- Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q et al. Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J. Biol. Chem.* 280(33), 29828–29836 (2005).
- 28- Cheung, I.Y., Hsu, K. and Cheung, N.K. (2012) Activation of peripheral-blood granulocytes is strongly correlated with patient outcome after immunotherapy with anti-gd2 monoclonal antibody and granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* 30, 426–432.
- 29- Cheung, N.K., Cheung, I.Y., Kushner, B.H., Ostrovnaya, I., Chamberlain, E., Kramer, K. and Modak, S. (2012) Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J. Clin. Oncol.* 30, 3264–3270.
- 30- Kushner, B., Kramer, K., Modak, S. and Cheung, N.K. (2007) Anti-GD2 antibody 3F8 plus granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for primary refractory neuroblastoma (NB) in the bone marrow (BM). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 526s.
- 31- Murray JL, Cunningham JE, Brewer H et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J. Clin. Oncol.* 12(1), 184–193 (1994).
- 32- Irie RF, Morton DL. Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83(22), 8694–8698 (1986).
- 33- Hank JA, Robinson RR, Surfus J et al. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 50(17), 5234–5239 (1990).
- 34- Ozkaynak MF, Sondel PM, Krailo MD et al. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. *J. Clin. Oncol.* 18(24), 4077–4085 (2000).

- 35- Yu, A.L. et al. (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 1324–1334.
- 36- Hank JA, Gan J, Ryu H et al. Immunogenicity of the hu14.18-IL2 immunocytokine molecule in adults with melanoma and children with neuroblastoma. *Clin.Cancer Res.* 15(18), 5923–5930 (2009).
- 37- Shusterman S, London WB, Gillies SD et al. Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) Phase II study. *J. Clin. Oncol.* 28(33), 4969–4975 (2010).
- 38- Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D, Chaumette T, Clemenceau B, Leprieur S, Bougras G, Supiot S, Mussini JM, Barbet J, Saba J, Paris F, Aubry J, Birklé S. A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent antitumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One.* 2011; 6(9):e25220. doi: 10.1371/journal.pone.0025220. Epub 2011 Sep 22
- 39- . Denis Cochonneau, Mickaël Terme, Alexis Michaud, Mylène Dorvillius, Nicolas Gautier, Jihane Frikeche, Nidia Alvarez-Rueda, Gwenola Bougras, Jacques Aubry, François Paris, Stéphane Birklé. Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 333 (2013) 194–204.
- 40- Terme M, Dorvillius M, Cochonneau D, Chaumette T, Xiao W, Diccianni MB, Barbet J, Yu AL, Paris F, Sorkin LS, Birklé S. Chimeric antibody c.8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One.* 2014 Feb 10;9(2):e87210. doi: 10.1371/journal.pone.0087210. eCollection 2014.
- 41- Samraj, A., Läubli, H., Varki, N., & Varki, A. (2014). Involvement of a non-human sialic acid in human cancer. *Frontiers in Oncology* .
- 42- Carr, A., Mullet, A., Vázquez, A., Alfonso, M., Mesa, C., Rengifo, E., y otros. (2000). A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* , 241-247.
- 43- Navarro, L., Chakrabandhu, K., de Leon, J., Rodriguez, S., Toledo, C., Carr, A., y otros. (2008). Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther* .



- 44- Scott, A. M., Geleick, D., Rubira, M., Clarke, K., Nice, E. C., Smyth, F. E., Old, L. J. (2000). Construction, Production, and Characterization of Humanized Anti-Lewis Y Monoclonal Antibody 3S193 for Targeted Immunotherapy of Solid Tumors Construction, Production, and Characterization of Humanized Anti-Lewis Y Monoclonal Antibody 3S193 for Target, 3254–3261.
- 45- Krug, L. M., Milton, D. T., Jungbluth, A. A., Chen, L., Quايا, E., Panditaskar, N., Old, L. (2007). Targeting Lewis Y (Le y ) in Small Cell Lung Cancer with a Testing Two Dose Levels. *Journal of Thoracic Cancer*, 2(10), 947–952.
- 46- Westwood, J. a, Murray, W. K., Trivett, M., Haynes, N. M., Solomon, B., Mileshekin, L., Kershaw, M. H. (2009). The Lewis-Y carbohydrate antigen is expressed by many human tumors and can serve as a target for genetically redirected T cells despite the presence of soluble antigen in serum. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 32(3), 292–301. doi:10.1097/CJI.0b013e31819b7c8e
- 47- Kelly, M. P., Lee, F. T., Smyth, F. E., Brechbiel, M. W., & Scott, A. M. (2006). Enhanced efficacy of 90Y-radiolabeled anti-Lewis Y humanized monoclonal antibody hu3S193 and paclitaxel combined-modality radioimmunotherapy in a breast cancer model. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(4), 716–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595507>
- 48- Eriksson SE<sup>1</sup>, Bäck T, Elgström E, Jensen H, Nilsson R, Lindegren S, Tennvall J. Successful radioimmunotherapy of established syngeneic rat colon carcinoma with 211At-mAb. *EJNMMI Res*. 2013 Apr 4;3(1):23. doi: 10.1186/2191-219X-3-23.
- 49- Eriksson Sophie E., Elgström Erika, Bäck Tom, Ohlsson Tomas, Jensen Holger, Nilsson Rune, Lindegren Sture, and Tennvall Jan. Sequential Radioimmunotherapy with 177Lu- and 211At-Labeled Monoclonal Antibody BR96 in a Syngeneic Rat Colon Carcinoma Model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. August 2014, 29(6): 238-246. doi:10.1089/cbr.2014.1625

- 50- Eriksson, S.E., Ohlsson, T., Nilsson, R., Tennvall, J. Repeated Radioimmunotherapy with <sup>177</sup>Lu-DOTA-BR96 in a Syngeneic Rat Colon Carcinoma Model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. March 2012, 27(2): 134-140. doi:10.1089/cbr.2011.1080.
- 51- Eriksson, S.E., Ohlsson, T., Nilsson, R., Tennvall, J. Treatment with Unlabeled mAb BR96 After Radioimmunotherapy with <sup>177</sup>Lu-DOTA-BR96 in a Syngeneic Rat Colon Carcinoma Model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. April 2012, 27(3): 175-182. doi:10.1089/cbr.2011.1132.
- 52- Clarke K, Lee FT, Brechbiel MW, Smyth FE, Old LJ, Scott AM. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy. *Clin Cancer Res*.2000;6:3621–3628
- 53- Ross, H. J., Hart, L. L., Swanson, P. M., Rarick, M. U., Figlin, R. A., Jacobs, A. D. Rudin. (2006). A randomized, multicenter study to determine the safety and efficacy of the immunoconjugate SGN-15 plus docetaxel for the treatment of non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 54(1), 69–77. doi:10.1016/j.lungcan.2006.05.020.
- 54- Elola, M. T., Capurro, M. I., Barrio, M. M., Coombs, P., Taylor, M., Drickamer, K., & Mordoh, J. (2007). Lewis X antigen mediates adhesion of human breast carcinoma cells to activated endothelium, 101(2), 161–174. doi:10.1007/s10549-006-9286-9.
- 55- Springer. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*, 594-602.
- 56- Hakomori, S. (2001). Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: Basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol*, 369-402.
- 57- Terasawa, K. (1996). Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Res*.
- 58- Laack, E. (2002). Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung, Helix pomatia Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor. *American Journal of Pathology*.

- 59- Brooks, S. (2000). The involvement of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. *Histol Histopathol*, 143-158.
- 60- Kawaguchi, T. (2006). Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? *Breast Cancer Res Treat*, 31-43.
- 61- Welinder, C. (2011). A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with in vivo anti-tumor activity. *Glycobiology*, 1097-1107.
- 62- Hubert, P. (2011). Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity Synapses Form in Mice during Tumor-Specific Antibody Immunotherapy. *Cancer Research*.
- 63- Pancino, G., Osinaga, E., Charpin, C., Mistro, D., Barque, J., & Roseto, A. (1991). Purification and characterisation of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4. *Br J Cancer*, 390-398.
- 64- Morita, N. (2009). Inhibition of cancer cell growth by anti-Tn monoclonal antibody MLS128. *BioScience Trends*, 32-37.
- 65- Danussi, C. (2009). A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology*, 1056-1067.
- 66- Ando, H. (2008). Mouse-Human Chimeric Anti-Tn IgG1 Induced Anti-tumor Activity against Jurkat Cells in Vitro and in Vivo. *Biol. Pharm. Bull*, 1739-1744.
- 67- Heimburg, J., Lum, M., Vjay, G., Jain, M., Almogren, A., & Rittenhouse-Olson, K. (2011). Cancer Vaccines and Carbohydrate Epitopes. *Vaccine*, 8802-8826.
- 68- Wolf, M., Ludwig, A., Fritz, P., & Schumacher, K. (1988). Increased expression of Thomsen-Friedenreich antigens during tumor progression in breast cancer patients. *Tumour Biol*, 190-194.
- 69- Cao, Y., Karsten, U., Liebrich, W., Haensch, W., Springer, G., & Schlag, P. (1995). Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation. *Cancer*, 1700-1708.
- 70- Kodar, K., Izotova, J., Klaamas, K., Sergejev, B., Järvekülg, L., & Kurtenkov, O. (2013). Aberrant glycosylation of the anti-Thomsen-Friedenreich

- glycotope immunoglobulin G in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*, 3573-3582.
- 71- Ghazizadeh, M., Oguro, T., Sasaki, Y., Aihara, K., Araki, T., & Springer, G. (1990). Immunohistochemical and ultrastructural localization of T antigen in ovarian tumors. *Am J Clin Pathol*, 315-321.
- 72- Glinsky, V., Glinsky, G., Rittenhouse-Olson, K., Huflejt, M., Glinskii, O., Deutscher, S., y otros. (2001). The Role of Thomsen-Friedenreich Antigen in Adhesion of Human Breast and Prostate Cancer Cells to the Endothelium. *Cancer Research*, 4851-4857.
- 73- Gassmann, P., Kang, M.-L., Mees, S., & Haier, J. (2010). In vivo tumor cell adhesion in the pulmonary microvasculature is exclusively mediated by tumor cell - endothelial cell interaction. *BMC Cancer*.
- 74- Rittenhouse-Diakun, K., Xia, Z., Pickhardt, D., Morey, S., Baek, M., & Roy, R. (1998). Development and characterization of monoclonal antibody to T-antigen: (gal beta1-3GalNAc-alpha-O). *Hybridoma*, 165-173.
- 75- Chaturvedi, R., Heimburg, J., Yan, J., Koury, S., Sajjad, M., H Abdel-Nabi, H., y otros. (2008). Tumor immunolocalization Using 124I-Iodine labeled JAA-F11 Antibody to Thomsen-Friedenreich alpha-linked Antigen. *Appl Radiat Isot.* , 278-287.
- 76- Heimburg, J., Yan, J., Morey, S., Glinskii, O., Huxley, V., Wild, L., y otros. (2006). Inhibition of Spontaneous Breast Cancer Metastasis by Anti-Thomsen-Friedenreich Antigen Monoclonal Antibody JAA-F11. *Neoplasia*, 939-948.
- 77- Ferguson, K., Yadav, A., Morey, S., Abdullah, J., Hrysenko, G., Ying Eng, J., y otros. (2014). Preclinical studies with JAA-F11 anti-Thomsen-Friedenreich monoclonal antibody for human breast cancer. *Future Oncol.* , 385-399.
- 78- Heczey, A., & Louis, C. U. (2013). Advances in chimeric antigen receptor immunotherapy for neuroblastoma. *Discovery Medicine*, 16(90), 287–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333408>
- 79- Sadelain, M., Brentjens, R., & Riviere, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design. *Cancer Discovery*, 3(4), 388–398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- 80- Kakarla, S., & Gottschalk, S. (2014). CAR T Cells for Solid Tumors - Armed and Ready to Go ? *The Cancer Journal*, 20(2), 151–155.

- 81- Anurathapan, U., Leen, A. M., Brenner, M. K., & Vera, J. F. (2014). Engineered T cells for cancer treatment. *Cytotherapy*, 16(6), 713–733. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.002
- 82- Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V, Dotti, G., Malcolm, K. (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature Medicine*, 14(11), 1264–1270. doi:10.1038/nm.1882.Virus-specific
- 83- Louis, C. U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G. D., Brenner, M. K. (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, 118(23), 6050–6. doi:10.1182/blood-2011-05-354449
- 84- Park, J. R., Digiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Jensen, M. C. (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), 825–33. doi:10.1038/sj.mt.6300104
- 85- Frost JD<sup>1</sup>, Hank JA, Reaman GH, Friedrich S, Seeger RC, Gan J, Anderson PM, Ettinger LJ, Cairo MS, Blazar BR, Krailo MD, Matthay KK, Reisfeld RA, Sondel PM. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer*. 1997 Jul 15;80(2):317-33.
- 86- Alvarez-Rueda N<sup>1</sup>, Leprieur S, Clémenceau B, Supiot S, Sébille-Rivain V, Faivre-Chauvet A, Davodeau F, Paris F, Barbet J, Aubry J, Birklé S. Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5613s-5620s.
- 87- Kramer K<sup>1</sup>, Humm JL, Souweidane MM, Zanzonico PB, Dunkel IJ, Gerald WL, Khakoo Y, Yeh SD, Yeung HW, Finn RD, Wolden SL, Larson SM, Cheung NK. Phase I study of targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancers using intra-Ommaya 131-I-3F8. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 1;25(34):5465-70

- 88- Oettgen, H.F. and Cheung, N.V. (1996) Targeting of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med.* 23, 145–149.
- 89- Oikawa. F, Kojima-Aikawa. K, Inoue. F, Suzuki. A, Tanaka. K, Tominaga. E and Aoki. D. HMMC-1, a human monoclonal antibody to fucosylated core 1 O-glycan, suppresses growth of uterine endometrial cancer cells. *Cancer Sci* | January 2013 | vol. 104 | no. 1 | 62–69
- 90- Shusterman S<sup>1</sup>, London WB, Gillies SD, Hank JA, Voss SD, Seeger RC, Reynolds CP, Kimball J, Albertini MR, et al. Antitumor activity of hu14.18IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4969-75. doi: 10.1200/JCO.2009.27.8861. Epub 2010 Oct 4.
- 91- Harel W<sup>1</sup>, Shau H, Hadley CG, Morgan AC Jr, Reisfeld RA, Cheresch DA, Mitchell MS Increased lysis of melanoma by in vivo-elicited human lymphokine-activated killer cells after addition of antiganglioside antibodies in vitro. *Cancer Res.* 1990 Oct 1;50(19):6311-5.
- 92- Kirkwood JM<sup>1</sup>, Mascari RA, Edington HD, Rabkin MS, Day RS, Whiteside TL, Vlock DR, Shipe-Spotloe JM. Analysis of therapeutic and immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer.* 2000 Jun 15;88(12):2693-702.
- 93- Pearce OM<sup>1</sup>, Läubli H, Verhagen A, Secret P, Zhang J, Varki NM, et al. Inverse hormesis of cancer growth mediated by narrow ranges of tumor-directed antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 22;111(16):5998-6003. doi: 10.1073/pnas.1209067111. Epub 2014 Apr 7.
- 94- Mahiuddin Ahmed, Nai-Kong V. Cheung. Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *FEBS Letters* 588 (2014) 288–297.
- 95- Catherine Rabu<sup>1</sup>, Richard McIntosh<sup>1</sup>, Zuzana Jurasova<sup>1</sup> & Lindy Durrant. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. *Future Oncol.* (2012) 8(8), 943–960.
- 96- Kirstine Lavrsen, Caroline B. Madsen, Morten G. Rasch, Anders Woetmann, Niels Ødum, Ulla Mandel, Henrik Clausen, Anders E. Pedersen, Hans H. Wandall. Aberrantly glycosylated MUC1 is expressed on the surface of breast cancer cells and a target for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Glycoconj J* (2013) 30:227–236. DOI 10.1007/s10719-012-9437-7

- 97- Bauernhofer, T., Samonigg, H., Regitnik, P., Weitzer, W., Lileg, B., Waxenecker, G., Nechansky, A. (2014). Safety and Therapeutic Efficacy of the Lewis Y Carbohydrate Specific Humanized Antibody MB311 in Patients with Malignant Effusion, 2014(January), 28–37.
- 98- Gregory Lee, Mingang Zhu, Bixia Ge, Anthony P. Cheung, Chien-Hsiang Chien, Song-Nan Chow, Yi-Peng Ding, and Hong-Xia Yao. Carbohydrate-associated Immunodominant Epitope(s) of CA215. Immunological Investigations, 41:317–336, 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer al Prof. Dr. Eduardo Osinaga por su compromiso y dedicación en la orientación de este trabajo.

A los funcionarios de la Biblioteca de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer por facilitarnos la bibliografía requerida, rápida y amablemente.