

## **INMUNOTERAPIA EN NEUROBLASTOMA**

**Dres. Claudia Sampor, Lorena Baroni, Guillermo Chantada**

### **INTRODUCCION**

A pesar de los avances en el tratamiento de las enfermedades malignas pediátricas, el cáncer es la segunda causa más común de muerte en niños mayores de 1 año en los países desarrollados. En Argentina, el cáncer representa la tercera causa de muerte en los niños, precedida sólo por los accidentes y las malformaciones congénitas<sup>1</sup>. Los niños con tumores sólidos malignos primarios multifocales, refractarios o recaídos siguen teniendo muy pobre pronóstico. Por otro lado, la mayoría de las terapias están asociadas con una significativa toxicidad, dando morbilidad a largo plazo y aumentando la tasa de enfermedades malignas secundarias. Esta falla ha llevado a un resurgimiento del interés en métodos alternativos para la erradicación de la enfermedad. La modulación inmune se convirtió en una opción particular.

El National Cancer Institute, define a la Inmunoterapia como el tratamiento para estimular o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer, las infecciones y otras enfermedades<sup>2</sup>. Asimismo, se la utiliza para disminuir ciertos efectos secundarios que pueden causar algunos tratamientos para el cáncer. Las sustancias usadas en la inmunoterapia incluyen los anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento y vacunas. Esas sustancias también podrían tener efectos antitumorales directos. También se la llama biotera-

pia, terapia biológica, terapia modificadora de la respuesta biológica (MRB). Las terapias inmunes relevantes son: citoquinas, vacunas, anticuerpos y terapia celular.

La alta tasa de recaída y la falta de nuevas modalidades terapéuticas exitosas en el neuroblastoma, ha hecho que este tumor se convirtiera en el pilar principal para la utilización de métodos alternativos. Es así como la modulación inmune se convirtió en una opción particular y esperanzadora en el neuroblastoma.

### **LA RESPUESTA INMUNE AL CANCER**

Las alteraciones genéticas en las células del cáncer, que les confieren sus propiedades de malignidad, también resultan en la expresión de proteínas o antígenos tumorales, que difieren de las células normales y tienen el potencial de ser identificados por el sistema inmune como extrañas. En estudios iniciales realizados en ratones se observó que el sistema inmune es capaz de reconocer y rechazar las células tumorales, por lo tanto, numerosos modelos tumorales en ratones fueron desarrollados con el objetivo de identificar la parte del sistema inmune responsable de la erradicación de los tumores. Estos estudios indican que las células T CD8+ y CD4+ juegan un rol crítico en el rechazo tumoral o en la inhibición del crecimiento tumoral<sup>3</sup>.

La inmunidad humoral está constituida por linfocitos B responsables de la producción de anticuerpos, mientras que la inmunidad celular es mediada por células T CD4+ y CD8+. Ambas ramas del sis-

---

Servicio de Hemato-Oncología.  
Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

tema inmune han sido estudiadas en el tratamiento del cáncer.

El sistema inmune además, puede ser dividido en 2 ramas diferentes, el innato y el adaptativo; los cuales tienen mecanismos capaces de reconocer y eliminar células tumorales. Los mecanismos efectores celulares, a diferencia de los anticuerpos, parecen ser los de mayor relevancia, con células T CD8+, natural killer y células NKT como sus principales protagonistas<sup>4</sup>.

La respuesta inmune innata, incluyendo las células NK y NKT, ofrece un mecanismo de defensa de primera línea, no específico, que opera dentro de las primeras horas y días. Además de ofrecer una protección directa contra el tumor, estas células también son importantes en estimular la respuesta inmune adaptativa a través de la liberación de citoquinas que ayudan a activar las células T CD8+<sup>4</sup>.

La respuesta inmune adaptativa toma varios días en desarrollarse, pero es altamente específica y ofrece una memoria inmunológica a largo plazo. Una vez activadas, las células T CD8+ desarrollan una potente actividad citotóxica. Estos linfocitos T citotóxicos son capaces de eliminar cualquier célula huésped que exprese su antígeno específico unido a moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por este motivo, estas células serían el componente más importante del sistema inmune en ofrecer inmunidad anti-tumoral a largo plazo.

En la mayoría de los pacientes con cáncer, la respuesta inmune espontánea es débil y falla en controlar en forma adecuada el tumor. Sin embargo, algunos estudios sugieren que en pacientes donde hay alguna evidencia de respuesta inmune, como la presencia de linfocitos infiltrando el tumor, habría una correlación favorable con el pronóstico y, ocasionalmente, con la regresión tumoral. Estudios iniciales muestran consistentemente el rol del sistema inmune en la prevención del cáncer inducido por virus como en ciertos linfomas (inducido por el Virus Epstein Barr)<sup>5</sup>. Por el contrario, en los pacientes que están crónicamente inmunosuprimidos, se observa aumento del riesgo de neoplasias. Esto respalda la hipótesis de que el sistema inmune tiene un rol en la protección contra los tumores<sup>5</sup>.

La inmunogenicidad intrínseca, o la habilidad del tumor para provocar una respuesta inmune, es variable dependiendo de cada tumor siendo algunos tumores, como el melanoma más inmunogénico que otros. Modelos animales sugieren que la inmunoterapia sería más exitosa en pacientes con tumores inmunogénicos en los que hay alguna evidencia de respuesta inmune anti-tumor espontánea<sup>4</sup>.

Las células tumorales son capaces de eludir el sistema inmune de diversas maneras. Las células malignas tienen disminuida o ausente la expresión de los antígenos asociados al cáncer o requieren de

moléculas coestimuladoras inmunes. Estas producen factores solubles inmunosupresores o estimulan la producción de células supresoras inmunes y la expresión de antígenos que inducen la apoptosis de efectores inmunes. Además, los antígenos asociados al cáncer son pobremente inmunogénicos o sobreexpresan auto-antígenos, lo que lleva a una incorrecta selección de eventos en el timo y anergia periférica<sup>6</sup>.

## LA RESPUESTA INMUNE EN EL NEUROBLASTOMA

De todas las neoplasias pediátricas, la inmunobiología del neuroblastoma ha sido quizás la más estudiada. Existe evidencia de infiltración por linfocitos en muchos neuroblastomas resecaados, cuya presencia se correlaciona en forma favorable con el pronóstico. El grado de infiltración linfocitaria es más llamativo en el pequeño número de pacientes con neuroblastoma que se presentan con el síndrome de opsoclonus-mioclonus (SOM). Aunque la etiología del desorden neurológico no está completamente dilucidada, parecería estar mediada inmunológicamente, por una hipotética reacción cruzada de autoinmunidad entre los antígenos presentes en el SNC y los antígenos del neuroblastoma. Los niños con neuroblastoma y SOM tienen un pronóstico oncológico muy favorable atribuido a la fuerte respuesta inmune observada en ellos. Sin embargo, los tumores de estos niños son generalmente de bajo grado y de histología bien diferenciada, los cuales son factores pronósticos bien establecidos, por lo tanto es difícil asegurar cuanto contribuye la respuesta inmune al resultado favorable<sup>6</sup>.

Se han identificado un número importante de antígenos tumorales, ampliamente expresados por las células del neuroblastoma (Tabla 1). La mayoría de estos son antígenos propios normales que comúnmente solo se expresan durante el desarrollo fetal o con distribución tisular limitada. Muchos de estos antígenos también son hallados en otros tumores, particularmente en otras neoplasias de origen neuroectodérmico, como el melanoma (GD2 y antígenos del cáncer testicular) y el cáncer de pulmón de células pequeñas (n-myc y antígenos hu). Un estudio demostró las células T CD8+ específicas para la supervivencia del péptido en la sangre periférica de 8 de 9 niños con neuroblastoma de alto riesgo, pero no en los controles sanos. Aunque estas células T específicas para antígenos del tumor no controlaron el crecimiento del tumor *in vivo*, la mayoría de ellas fueron completamente funcionales y capaces de matar líneas celulares de neuroblastoma *in vitro*. En muchos otros estudios se ha demostrado que algunos de estos antígenos son capaces de provocar respuesta inmune espontánea en pacientes con otras neoplasias como el melanoma. Aunque los estudios pediátricos son

**TABLA 1: REPORTE DE ANTIGENOS ASOCIADOS A TUMOR EXPRESADOS EN NEUROBLASTOMA.**

Antígeno	Naturaleza del antígeno	Expresión tumoral	Expresión en tejido normal
N-MYC	Factor de transcripción y protooncogen	Sobreexpresión >40% de los pacientes con enfermedad metastásica	Baja expresión luego del desarrollo fetal
GD2	Glicolípidio	100% en neuroblastoma	Neuronas del SNC y fibras periféricas del dolor
Tirosin-hidroxilasa	Biosíntesis de catecolaminas	100% de neuroblastomas	Médula adrenal y neuronas dopaminérgicas del SNC
Expresión preferencial de antígenos en melanoma (PRAME)	Antígeno del cáncer en línea germinal	93% en muestras de neuroblastoma	Expresión únicamente en testículos normales
Familia del antígeno A del melanoma	Antígeno del cáncer en la línea germinal	8/10 de expresión en neuroblastoma	Pequeña expresión en tejidos normales diferentes al testículo
Antígenos Hu	Proteínas de unión al RNA neuronas-específicas	80% de neuroblastomas	Tejidos nerviosos periféricos y centrales
Survivina	Inhibidor de la apoptosis	Expresión 26/26 en neuroblastomas de alto riesgo	Baja expresión o ausente en tejidos sanos
NY-ESO-1	Antígenos del cáncer en la línea germinal	82% de neuroblastomas	Expresión restringida a tejidos normales de testículos
ALK	Receptor de tirosin-kinasa	Expresión 14/16 de los neuroblastomas	Limitada expresión en tejidos normales

pequeños, pueden dar alguna evidencia de que el sistema inmune puede reconocer antígenos expresados en las células del neuroblastoma<sup>6</sup>.

### INMUNOTERAPIA EN EL NEUROBLASTOMA

El Neuroblastoma es un cáncer del sistema nervioso simpático responsable del 12% de las muertes asociadas con cáncer en niños menores de 15 años<sup>7</sup>. Es una enfermedad heterogénea en la que cerca del 50% de los pacientes tiene un genotipo de alto riesgo caracterizado por diseminación generalizada y una pobre supervivencia a largo plazo, incluso cuando se utilizan tratamientos multimodales intensivos. Previo al advenimiento de la inmunoterapia, los resultados iniciales del último estudio controlado y randomizado que presentaba una mejoría considerable en los resultados, se publicó hace cerca de una década y estableció la terapia estándar para el neuroblastoma de alto riesgo: terapia mieloablativa con rescate de células madre, seguida del tratamiento de la enfermedad mínima residual con isotretinoína<sup>8</sup>. Sin embargo, más de la mitad de los pacientes que reciben la terapia estándar sufren una recaída y acaban falleciendo a causa del tumor. Por eso, una vez alcanzada la remisión, el mayor obstáculo es curar la enfermedad residual refractaria a la quimioterapia que se escapa de los actuales métodos de detección. Esta falla ha llevado a un resurgimiento del interés en métodos alternativos para la erradicación de la enfermedad.

La modulación inmune se convirtió en una opción particular<sup>8,9</sup>.

### ¿POR QUE ES INEFECTIVA LA RESPUESTA INMUNE AL NEUROBLASTOMA PARA CONTROLAR EL CRECIMIENTO TUMORAL?

A pesar de la evidencia de que el sistema inmune puede reconocer al neuroblastoma, está claro que en la mayoría de los pacientes la respuesta inmune es inefectiva, y por definición en aquellos niños que presentan clínicamente el tumor, la respuesta inmune ha fallado en erradicar el mismo. Un número importante de mecanismos contribuyen a este escape inmune (Figura 1).

El primer obstáculo para desarrollar inmunidad efectiva antitumoral es que la mayoría de los antígenos tumorales están presentes en muy pequeña cantidad, por lo que es muy probable que las células T nunca se encuentren con ellos. En segundo lugar, muchos de los mecanismos inmunoregulatorios que son beneficiosos en prevenir la autoinmunidad pueden ser una barrera para alcanzar la inmunidad tumoral. Para su efectiva activación, las células T no solo se unen a su antígeno específico, sino también a un número de moléculas co-estimuladoras. En ausencia de las señales co-estimuladoras en el relativo medio ambiente no inflamatorio tumoral, no solo la respuesta de las células T anti-tumor es subóptima, sino que se puede desarrollar un estado de "tolerancia" o falta de respuesta a los antígenos tumorales.

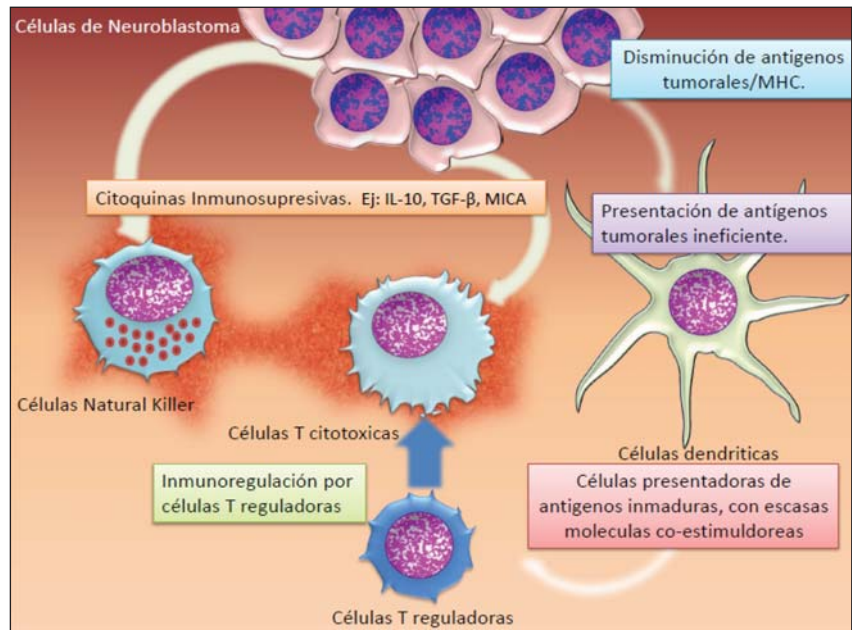
<http://www.medicinainfantil.org.ar>  
 Además de estos factores relacionados al huésped, un número de mecanismos han sido identificados en las células del neuroblastoma que pueden evolucionar para evadir cualquier respuesta inmune que sea generada. La mayoría de los neuroblastomas expresan niveles muy bajos o ausentes de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Debido a que las células T CD8+ solo reconocen sus antígenos blanco cuando los mismos son presentados unidos a las moléculas de clase I del MHC, el *down regulation* de esta molécula evita en forma efectiva este importante brazo del sistema inmune. La falta de expresión de moléculas de clase

I del MHC debería hacer a las células del neuroblastoma un blanco ideal para las células NK, ya que uno de los principales mecanismos por el cual las células NK reconocen a las células anormales es por la detección de la ausencia o falta de dichas moléculas en su superficie celular. Sin embargo, las células del neuroblastoma secretan moléculas similares a MHC solubles, como la proteína A relacionada a la MHC de clase I de cadena, que tienen un marcado efecto inhibitorio sobre las células NK. Un número de citoquinas inhibitorias, como el factor de crecimiento transformante beta, la IL 10 y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF), pueden ser secretadas por las células del neuroblastoma contrarrestando cualquier respuesta inmune anti-tumor que sea generada.

La evasión del sistema inmune es un proceso dinámico, con algunas variantes tumorales que son más capaces que otras de sobrevivir en el ambiente inmunológico. Las células tumorales presentes en el momento de la presentación clínica del tumor, ya han demostrado su resistencia a la respuesta inmune generada por el huésped, pero mecanismos adicionales de escape se pueden desarrollar durante la inmunoterapia<sup>4,10</sup>.

### **SUPERAR LA EVASION INMUNE PARA GENERAR UNA INMUNIDAD EFECTIVA ANTI-NEUROBLASTOMA**

A través de los años, muchas estrategias diferentes han sido empleadas para tratar de alcanzar inmunidad terapéutica anti-neuroblastoma. Aunque muchas de estas terapias han probado ser exitosas en modelos animales, muy pocas se han aplicado en estudios clínicos de pacientes. Hasta la fecha,



**Figura 1:** Mecanismos de escape inmune en el Neuroblastoma.

la mayoría de éstas han sido terapias inmunes pasivas, en las cuales, anticuerpos o células inmunes son transferidas al paciente no siendo necesaria la participación del sistema inmune del mismo. Otras terapias inmunes son activas, en las cuales el paciente es de alguna forma inmunizado en un intento de estimular una respuesta inmune anti-tumor. Esto último tiene la ventaja de alcanzar potencialmente una inmunidad a largo plazo, pero es más difícil de realizar, particularmente en el contexto de los niños que han recibido quimioterapia inmunosupresora a altas dosis como parte del tratamiento del neuroblastoma. (Figura 2)<sup>6,11</sup>.

### **TERAPIAS CON CITOQUINAS**

Las citoquinas juegan un rol importante en la regulación del sistema inmune, ya sea estimulando la respuesta inmune contra los antígenos u orientando la reacción del huésped en un rango de respuestas que va desde la citotoxicidad a la tolerancia inmune. Sin embargo, está bien establecido que los pacientes con neuroblastoma luego de haber recibido un tratamiento tan intenso no pueden obtener respuestas inmunes óptimas hacia los antígenos que se presentan. Por lo tanto las citoquinas exógenas podrían ser usadas para estimular la respuesta inmune del paciente contra el neuroblastoma residual.

La IL 12 fue evaluada por su actividad antitumor en varios estudios preclínicos y clínicos, ya que es un potente activador de las células NK y linfocitos T, los cuales juegan un rol esencial en la actividad antitumoral. También promueve el desarrollo de inmunidad humoral estimulando las células T CD4+. La IL12 juega un rol activo en la estimulación de



la respuesta inmune antitumor en el neuroblastoma. Además, se investigó sobre la combinación posible de citoquinas que aumenten la respuesta de la IL12, por ejemplo con IL2 o con IL18, comprobándose un mayor efecto antitumor, lo cual podría mejorar el impacto clínico. Sin embargo, la combinación óptima de citoquinas debe ser determinada aún<sup>12,13</sup>.

La IL12 ha sido usada para tratar el carcinoma de células renales y el melanoma en adultos en varios estudios de fase I y II, siendo relativamente bien tolerada, con efectos adversos tales como fatiga, aumento de transaminasas y disminución del recuento de glóbulos blancos. Los resultados de los mismos informan que la terapia

con IL12 sería útil para tratar neoplasias en humanos, pero que debería ser combinada con otro tipo de inmunoterapia, como anticuerpos o vacunas, para obtener resultados óptimos<sup>3</sup>.

### TERAPIA CON VACUNAS

La inmunoterapia pasiva comprende la administración de anticuerpos, citoquinas o células efectoras inmunes con el objetivo de dirigir una respuesta inmune hacia la enfermedad residual, la cual suele ser transitoria. Por el contrario, la inmunidad activa requiere que el huésped desarrolle una respuesta inmune contra un blanco determinado, y tiene la ventaja de ayudar al cuerpo a desarrollar una respuesta inmune de larga duración contra los antígenos tumorales y puede ayudar a la vigilancia del futuro tumor.

Sin embargo, la creación exitosa de terapia inmune activa contra un tumor en particular puede ser muy difícil, debido a un obstáculo importante: evasión del sistema inmune por parte del tumor y la inmunosupresión debido al intenso tratamiento recibido. A pesar de estos desafíos, progresos significativos se han logrado en el desarrollo de terapias inmunes activas para el neuroblastoma<sup>14</sup>.

Varios grupos de estudio trataron de optimizar la terapia con vacunas para el neuroblastoma. Diferentes tipos de vacunas han sido usadas en un intento de mejorar la respuesta inmune modulando la producción de citoquinas.

Huebener y colaboradores crearon una vacuna de ADN con la tirosin hidroxilasa como blanco, enzima altamente expresada en el neuroblastoma. La administración de esta vacuna, tanto profilácticamente como terapéuticamente, disminuyó el

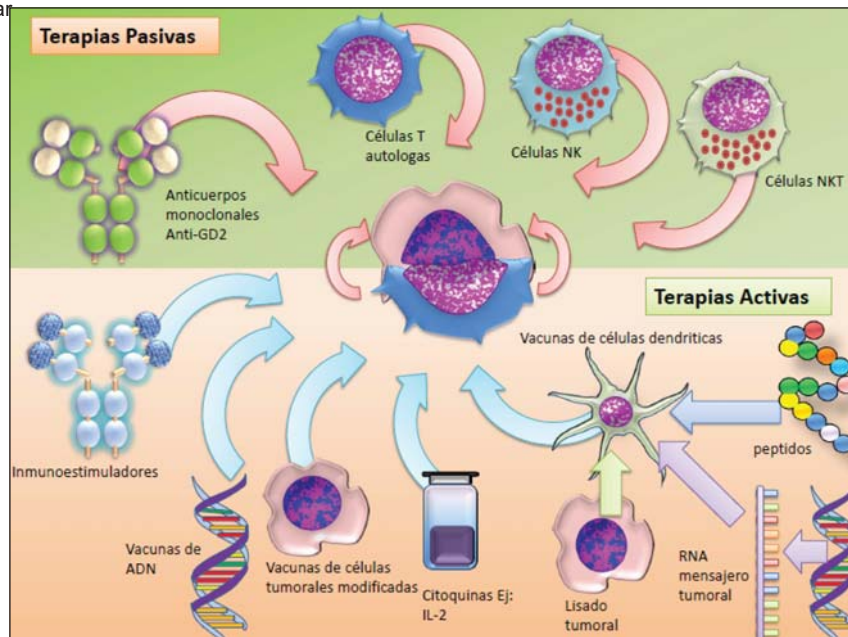


Figura 2: Diferentes enfoques de terapias inmunes en niños con Neuroblastoma.

crecimiento tumoral y previno la diseminación metastásica al hígado en modelo animal<sup>3</sup>.

Fest y colaboradores usaron el GD2 como blanco en sus vacunas. El GD2 es un gangliósido relativamente específico para el neuroblastoma expresado en la superficie celular, haciéndolo blanco ideal para la terapia inmune. Desafortunadamente, dado que el GD2 es un glicolípido, no provoca una fuerte respuesta inmune y funciona como un antígeno independiente de las células T, lo que impide una respuesta duradera. Los estudios realizados hasta el momento apoyan la posibilidad de crear una vacuna contra el neuroblastoma, pero también la importancia de optimizar la respuesta a la vacuna a través de la estimulación concomitante del sistema inmune<sup>7,14,15</sup>.

El uso de vacunas contra tumores ha mostrado ser promisorio, y el optimizar su desarrollo resultará en un tratamiento más efectivo contra el neuroblastoma.

### TERAPIA CON ANTICUERPOS (INMUNOTERAPIAS PASIVAS)

El desarrollo tecnológico de los anticuerpos monoclonales (mAb) por Kohler y Milstein en 1976 abrió la puerta a una relativamente fácil producción de anticuerpos que podían reconocer antígenos tumorales y ser capaces de unirse a las células malignas, las cuales serían destruidas por el complemento y células efectoras del sistema inmune. Los efectos terapéuticos han sido limitados por falla en el reclutamiento inmune efectivo y el *down-regulation* de los antígenos blancos. Además, la mayoría de los mAbs de roedores son en sí mismos proteínas extrañas e inmunogénicas, provocando

el desarrollo de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), si se indican dosis repetidas al paciente. Esto resulta en potenciales reacciones alérgicas severas, y también en el aumento del clearance del anticuerpo del suero reduciendo de esta forma su eficacia. Aunque esta cuestión ha sido ampliamente eludida con ingeniería genética quimérica (roedor/humano), mAbs humanizados o completamente humanos, la falta de eficacia de la mayoría de los anticuerpos contra antígenos tumorales es un problema. Muchos intentos han sido hechos para aumentar la muerte de las células tumorales mediante la conjugación de mAbs con drogas citotóxicas, toxinas o isótopos radioactivos. El mAbs 3F8 conjugado con I<sup>131</sup> ha sido usado en estudios fase I/II con respuestas parciales y completas en un número de pacientes. La mielotoxicidad fue severa en todos los pacientes, la mayoría de los cuales requirió rescate con células progenitoras autólogas. No existen datos clínicos suficientes para afirmar si los inmunocombinados ofrecerían una ventaja sobre los mAbs anti-GD2 desnudos, pero es posible que puedan ser usados en los regímenes condicionantes mieloablativos existentes usados antes del trasplante autólogo en los pacientes de alto riesgo<sup>6</sup>.

Los anticuerpos monoclonales contra el cáncer tienen como blanco antígenos específicos de la superficie celular y están siendo usados cada vez más para tratar neoplasias hematológicas y tumores sólidos debido a su vida media larga, baja toxicidad y alta afinidad y especificidad. El efecto antitumoral de los anticuerpos puede ser independiente o dependiente del sistema inmune. El mecanismo inmuno-mediado incluye: citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento y la habilidad de los anticuerpos monoclonales para alterar el entorno de las citoquinas o mejorar el desarrollo de una respuesta inmune antitumor activa. Los efectos no mediados por el sistema inmune generan el bloqueo de la señal para sobrevivir de la célula neoplásica. Los anticuerpos también pueden ser usados como agentes dirigidos, ya que cuando se los une a drogas, radioisótopos o toxinas pueden matar células tumorales entregando estos agentes en altas concentraciones directamente en el tumor<sup>3</sup>.

## ANTICUERPOS Y NEUROBLASTOMA

De las potenciales terapias inmunes para el neuroblastoma, las más establecidas en los humanos son las terapias basadas en anticuerpos dirigidos contra el GD2.

El GD2 está expresado en forma uniforme en los neuroblastoma<sup>7</sup>. Su función no está completamente establecida, pero se piensa que juega un rol importante en la fijación de las células tumorales a las proteínas de la matriz extracelular. La expresión de GD2 en tejidos normales de adultos y niños está

restringida al SNC, nervios periféricos y melanocitos de la piel. Debido a la relativa selectividad de expresión combinada con su presencia en la superficie celular, el GD2 es un blanco atractivo para esta clase de terapéutica. Diferentes anticuerpos anti-GD2 han sido desarrollados para uso clínico en las últimas 2 décadas, los cuales se revisan a continuación:

### Anticuerpos murinos anti-GD2

**3F8:** es un anticuerpo monoclonal murino anti-GD2 de tipo IgG3 desarrollado por Cheung y colaboradores con las células del neuroblastoma como blanco primariamente. Estudios *in vitro* sugieren que la muerte de las células tumorales es mediada por el complemento humano y otras células efectoras inmunes como linfocitos, monocitos y neutrófilos<sup>3,7</sup>.

En los estudios de fase I y II realizados, se observaron respuestas parciales en los pacientes con neuroblastoma<sup>3,7</sup>. Los efectos adversos observados fueron: hipertensión arterial (dosis limitante), dolor severo y urticaria. Todos los pacientes desarrollaron anticuerpos humanos anti-murino (HAMA) contra el 3F8. La actividad anti-tumor limitada lo haría más beneficioso en pacientes con enfermedad mínima residual.

La combinación del 3F8 con GM-CSF es una estrategia que quizás aumentaría la citotoxicidad dependiente de células y mediada por anticuerpos y fagocitos. Esta combinación fue evaluada en pacientes con neuroblastoma de alto riesgo, siendo beneficiosa<sup>7,9</sup>.

### Anticuerpos anti-GD2 quiméricos humano-murino

**Ch14.18:** es un anticuerpo en el cual la región humana constante Fc de una IgG1 está unida a la porción Fab del anticuerpo 14G2a murino. Retiene la especificidad anti-GD2 y la habilidad de unirse a los tumores GD2 positivos, y es 50-100 veces más eficiente en mediar la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos *in vitro* comparado con el anticuerpo murino 14G2a<sup>3,7</sup>.

Este anticuerpo fue evaluado en diferentes estudios de fase I, observándose efectos colaterales como dolor, fiebre, urticaria, prurito y rash. No se detectaron HAMA.

En el estudio cooperativo alemán para el neuroblastoma NB90 y NB97, los pacientes con diagnóstico nuevo de neuroblastoma recibieron ch14.18 en la fase de mantenimiento del tratamiento en una rama, otros quimioterapia a bajas dosis y la tercera no recibió nada más después de la terapia inicial. No hubo diferencia significativa en la supervivencia libre de eventos entre las 3 ramas de tratamiento, sin embargo la supervivencia global fue mejor en el grupo tratado con el ch14.18<sup>3,16,17</sup>.

## INMUNOCITOQUINAS

Han sido desarrolladas con el objetivo de aumentar la eficacia de la terapia con anticuerpos y minimizar la toxicidad sistémica asociada con el agregado de las citoquinas.

Las inmunocitoquinas resultan de la fusión de anticuerpos monoclonales, en los cuales la porción terminal Fc está unida a una citoquina. El anticuerpo se une al blanco de interés en la célula tumoral y le entrega altas concentraciones de la citoquina directamente en el medioambiente tumoral, para atraer a las células efectoras del sistema inmune con el fin de destruir las mismas.

Los anticuerpos anti-GD2 han mostrado una promisorio actividad anti-tumor en los niños con neuroblastoma. Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos para humanizar estos anticuerpos, y asociarles citoquinas para aumentar la respuesta de las células efectoras del sistema inmune, el potencial terapéutico de estos anticuerpos aun debe ser optimizado. Una estrategia para mejorar la eficacia de estos anticuerpos es la modificación en la estructura del mismo para reducir los efectos inmunes no deseados y aumentar los efectos antitumoral deseados. El modificar una región determinada del anticuerpo puede ser crítica en la activación del complemento, lo que podría disminuir algunos de los efectos colaterales observados. Un inconveniente potencial de disminuir la activación del complemento es que podría reducir la respuesta antitumor del anticuerpo.

El desarrollo de anticuerpos anti-GD2 ha sido un desafío, sin embargo, la respuesta antitumor observada ha promovido estudios para tratar de mejorar esta terapia. La promesa en la terapia con anticuerpos, reside en el tratamiento de la enfermedad mínima residual. Estos estudios requieren gran número de pacientes en estudio durante un largo período de tiempo para evaluar el beneficio de este tratamiento<sup>6</sup>.

## TERAPIA CELULAR

El trasplante alogénico se intentó en niños con neuroblastoma a partir de 1980, pero el resultado fue pobre en parte debido a la alta mortalidad asociada al trasplante y a la enfermedad injerto contra huésped<sup>3</sup>. Sin embargo, el renovado interés en el trasplante alogénico para los tumores sólidos en pacientes adultos ha llevado a muchos estudios piloto que han indicado la presencia del efecto injerto versus tumor. Esto ha generado interés en la terapia celular inmune para el neuroblastoma, especialmente debido a que el cuidado intensivo de los pacientes que reciben trasplante alogénico ha mejorado considerablemente. En los pacientes en los cuales el trasplante alogénico ha resultado efectivo para el tratamiento de tumores sólidos, el efecto injerto versus tumor se acompañó general-

mente de la enfermedad injerto versus huésped<sup>6</sup>.

La existencia del efecto injerto versus leucemia ha sido ampliamente apoyado por datos experimentales y clínicos, pero se conoce mucho menos acerca del efecto injerto versus tumor en los tumores sólidos. En el trasplante alogénico, células efectivas del huésped son reconocidas como extrañas por las células T aloreactivas derivadas del donante, lo que resulta en enfermedad injerto contra huésped. Los antígenos derivados de las proteínas destruidas son presentados en la superficie de células presentadoras de antígenos por moléculas de clase I o II del MHC. En el contexto de un complejo mayor de histocompatibilidad idéntico entre el donante y el receptor, la enfermedad injerto contra huésped resulta cuando los antígenos menores de histocompatibilidad son unidos y presentados en las grietas de las moléculas del MHC, permitiendo la activación de las células T del donante. Estas bases para la enfermedad injerto contra huésped, son sólo una forma de alcanzar el efecto injerto versus tumor.

Los linfocitos citotóxicos pueden tener como blanco muchos antígenos hallados en las células malignas. Estos incluyen antígenos restringidos a ciertas líneas encontrados en tumores de origen similar y en células normales relacionadas (por ejemplo GD2 expresado en neuroblastomas), antígenos hallados en tumores de origen diferente pero no en el tejido normal, y antígenos específicos de tumor producidos por genes mutantes dentro del tumor. La asociación observada de la enfermedad injerto versus huésped y el efecto injerto versus tumor probablemente ocurre cuando las células del tumor y las células normales del huésped comparten el antígeno blanco. Sin embargo, debido a que el tumor también expresa antígenos que son únicos de las células tumorales, o tienen mayor expresión del antígeno blanco comparado con el tejido normal, es posible tener efecto injerto versus tumor sin enfermedad injerto versus huésped<sup>3</sup>.

Diferentes grupos han demostrado que es posible activar células T o NK *in vitro* y luego infundirlas en el ratón con neuroblastoma con beneficio terapéutico<sup>4</sup>. *In vitro*, las condiciones pueden ser manejadas para obtener una población de células efectoras altamente activadas que puedan tener actividad citotóxica *in vivo*. Sin embargo, trasladar esto en tratamiento para los pacientes, en particular niños, es un desafío. No solo es potencialmente difícil obtener suficientes células autólogas antígeno-específicas, sino que también lo es su expansión y activación. Pocos estudios clínicos han sido reportados pero ninguno ha mostrado beneficio terapéutico significativo.

Sin embargo, otro enfoque para generar un gran número de células T específicas contra el neuroblastoma es modificar genéticamente células T

autólogas específicas de virus para expresar un receptor de antígeno quimérico. Las células T específicas de virus de Epstein Barr constituyen una población significativa de células T que pueden ser fácilmente expandibles *in vitro*. Su función efectora citotóxica puede ser redirigida por medio de la expresión de receptores de antígenos quiméricos que unen las cadenas pesadas y livianas de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-GD2 a la región intracelular del receptor de células T. Combinando la especificidad de los mAbs anti-GD2 con la potente función efectora de las células T en esta forma, potencialmente provee una terapia inmune muy potente. El primer estudio Fase I con células T quiméricas en niños con neuroblastoma refractario o recaído ha sido recientemente reportado con resultados alentadores. La necrosis o regresión tumoral fue vista en 4 de 8 niños con enfermedad evaluable, incluyendo un caso de remisión completa. Más estudios son necesarios para establecer si este enfoque puede ofrecer algún beneficio clínico por sobre los mAbs anti-GD2 desnudos.

En vista del nuevo potencial de las terapias inmunes combinadas, los resultados actuales de usar terapias celulares alogénicas para el neuroblastoma no son suficientes para sacar conclusiones. Dos estudios realizados a mediados de los 90 sugirieron que el trasplante alogénico no es superior al autólogo, que es la indicación actual Standard para el neuroblastoma de alto riesgo<sup>15</sup>.

Los nuevos conceptos sobre el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas alogénicas para el neuroblastoma y otros tumores sólidos no están centrados en aumentar la intensidad de la quimioterapia y reducir la carga tumoral, sino en el efecto injerto versus tumor.

## **EXPERIENCIA: LA INMUNOTERAPIA EN EL NEUROBLASTOMA**

Relativamente pocas de las terapias inmunes que mostraron efecto en estudios preclínicos de modelos de neuroblastomas llegaron a la fase de uso humano. Esto es debido, en parte, a las dificultades que se plantean para realizar estudios clínicos Fase I/II en niños, considerando el pequeño número de niños disponibles para el reclutamiento. Además de esto, a diferencia de las terapias convencionales, la mayoría de las terapias inmunes son específicas de cada paciente, o mejor dicho, de cada enfermedad. Debido a que los niños con neuroblastoma representan un pequeño porcentaje de los niños con cáncer, solo existe escaso interés comercial en desarrollar terapias específicas para esta patología. Los tratamientos, como los mAbs y las vacunas con DNA podrían ser más fáciles de utilizar en la clínica que las vacunas celulares complejas<sup>11</sup>.

Muchas de las terapias inmunes que alcanzan los estudios clínicos no progresan más allá de los

estudios Fase I/II debido a la falta de eficacia en niños pre tratados intensamente, y generalmente con grandes masas y estadio final de su enfermedad. Quizás la inmunoterapia será beneficiosa en niños con neuroblastoma si es administrada a pacientes con enfermedad mínima residual y relativo buen estado general. Por lo cual, sería más apropiado introducir nuevas terapias inmunes en pacientes que han completado los tratamientos Standard y continúan con riesgo alto de recaer, por ejemplo aquellos con enfermedad mínima residual positiva por métodos sensibles.

El priorizar los estudios clínicos debe estar basado en su relativa eficacia así como también en la practicidad de su administración en los pacientes. El paradigma tradicional de los estudios de Fase I de escalada de dosis hasta que la dosis máxima tolerada sea establecida no es necesario para los nuevos agentes de terapia inmune. Tanto para las evaluaciones inmunológicas como moleculares, los ensayos deberían estar estandarizados, permitiendo así la comparación entre estudios y de esta forma, la selección de la terapia más promisoría para llevarla a un gran estudio Fase II/III.

Un enfoque prometedor para tratar la enfermedad mínima residual es la inmunoterapia enfocada a un antígeno asociado al tumor, el disialogangliósido GD2, que se expresa uniformemente en los neuroblastomas. En los tejidos humanos normales, la expresión del GD2 se restringe a las neuronas, melanocitos de la piel y fibras nerviosas sensoriales periféricas. La alta expresión de GD2 en los neuroblastomas y su restringida distribución en los tejidos normales hace que los anticuerpos monoclonales anti-GD2 sean potencialmente adecuados para la inmunoterapia.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos suele estar deprimida en pacientes de cáncer pero puede aumentarse mediante citoquinas independientes llamadas GM-CSF e interleucina-2. Estas citoquinas aumentan el número de granulocitos o macrófagos y linfocitos respectivamente y mejoran su citotoxicidad.

La viabilidad de combinar anticuerpos monoclonales anti GD2 con citoquinas fue demostrado en un ensayo fase 2 de ch14.18 y GM-CSF del Grupo Oncológico Pediátrico (COG) y un estudio fase 1 de 14.G2a e interleucina 2 del Grupo de cáncer Pediátrico<sup>3</sup>. Otra consideración fue que los mayores efectos clínicos se verían si la inmunoterapia se suministraba a pacientes con enfermedad mínima residual. Esta hipótesis se sostiene por el relativamente pequeño número de respuestas completas o parciales a los anticuerpos monoclonales anti GD2 (administrados con o sin interleucinas) en niños que han sufrido una recaída del neuroblastoma<sup>3</sup>.

En pacientes con neuroblastoma de alto riesgo recién diagnosticado, buscamos la consecución de



la enfermedad mínima residual mediante el uso de terapia convencional de inducción y terapia intensiva de consolidación con trasplante autólogo de células madre. Administrar anticuerpos anti-GD2 con citoquinas tras el trasplante autólogo de células madre puede también estimular la activación de células inmunes y la eliminación de la inmunosupresión. Dos pequeños estudios pilotos secuenciales en fase 1 de ch14.18 en combinación con GM-CSF o con GM-CSF e interleucina-2, demostraron la viabilidad de suministrarlo durante el periodo siguiente al post trasplante<sup>3</sup>. El segundo de esos estudios demostró una estimación de supervivencia global a 3 años del 78%, reflejando una mejora en comparación con controles históricos

El COG llevó a cabo el estudio randomizado de fase 3 ANBL0032, para comparar si agregar inmunoterapia (ch14.18 con GM-CSF e IL2) al tratamiento con isotretinoína mejora la supervivencia de los niños con neuroblastoma de alto riesgo en remisión luego del tratamiento mieloablativo y rescate con *stem cell*, en comparación con el uso de isotretinoína sola<sup>9</sup>. El objetivo era aumentar la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos de las células tumorales GD2 positivas. En dicho estudio se incluyeron 226 pacientes con Neuroblastoma de alto riesgo, definido estrictamente por el COG, donde se observó una estimación a 2 años para la supervivencia libre de eventos del 66±5% en el grupo de inmunoterapia vs. 46±5% en el grupo de terapia estándar (P = 0.01). La inmunoterapia fue también superior al grupo de terapia estándar en relación a la tasa estimada de supervivencia general (86±4% vs. 75±5% a 2 años, P = 0.02). También se analizó el efecto de la inmunoterapia en el subgrupo de pacientes de 1 año o más de edad que tenían enfermedad en estadio 4, según el Sistema Internacional de Estadía del Neuroblastoma (INSS), en el momento del diagnóstico, ya que este subgrupo supone la mayoría de los casos de alto riesgo (179 de 226 pacientes randomizados). La tasa de supervivencia libre de eventos fue considerablemente mayor en el grupo de inmunoterapia (63±6% a 2 años) que en el grupo de terapia estándar (42±6% a 2 años, P = 0.02). También hubo una tendencia hacia la mejora de supervivencia general (84±4% a 2 años) con inmunoterapia comparado con la terapia estándar (76±5% a 2 años, P = 0.10)<sup>9</sup>.

### ESTRATEGIAS FUTURAS

La inmunoterapia activa específica es un campo promisorio en la investigación del cáncer. Los gangliósidos N-glicolilados, y particularmente el gangliósido N-glicolilado GM3, han recibido gran atención como un blanco privilegiado en la terapia del cáncer. Éstos son prácticamente indetectables en tejidos y fluidos humanos sanos, pero ampliamente expresados en tejidos tumorales.

Muchos estudios clínicos se han llevado a cabo con el anticuerpo murino anti-idiotipo monoclonal racotumomab (formalmente llamado 1E10), en forma de vacuna, para tratamiento del cáncer de mama, pulmón y melanoma, los cuales expresan en la superficie de sus células, gangliósidos N-glicolilados<sup>18,19</sup>.

Los gangliósidos son glicolípidos complejos, abundantes en la membrana plasmática de diversos tipos celulares de origen neuroectodérmico, donde se ubican formando clusters. Las cadenas glicosídicas de los gangliósidos contienen al menos un residuo de ácido siálico y se encuentran expuestas en la superficie celular. El ácido siálico puede tener algunas variaciones, siendo los más comunes en mamíferos las versiones N-acetilada (Neu-Ac) y N-glicolilada (Neu-Gc). Muchos de estos compuestos glicolípidicos se expresan en abundancia en células tumorales, siendo considerados como blancos promisorios para la inmunoterapia, como es el caso del monosialogangliósido N-glicolil GM3<sup>20-23</sup>.

En el Hospital Garrahan se está llevando adelante un ensayo clínico de Fase I en pacientes pediátricos con diagnóstico de patologías oncológicas que expresen gangliósidos N-glicolilados y que han demostrado con anterioridad refractariedad o resistencia a los tratamientos oncológicos convencionales. El objetivo principal es evaluar la toxicidad aguda y dosis tolerada, y secundariamente, la respuesta inmunológica y clínica al tratamiento con racotumomab.

El mecanismo de acción de racotumomab es todavía motivo de estudio. Por un lado, es probable que la inducción de una respuesta inmunológica específica hacia el gangliósido N-glicolil GM3 juegue un rol importante, mediante cualquiera de los mecanismos de citotoxicidad reconocidos, incluyendo citotoxicidad mediada por complemento, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, y la acción efectora de linfocitos T citotóxicos o células NKT. De manera adicional, podrían producirse procesos de apoptosis tumoral e inhibición de la neovascularización tumoral.

En el campo de la inmunoterapia del cáncer, las vacunas a base de anticuerpos monoclonales anti-idiotipo presentan ventajas características: A) **Biológicas:** al mimetizar antígenos tumorales en su idiotipo, pueden desencadenar una respuesta de presentación antigénica en un ambiente molecular diferente lo cual permite eludir ciertos mecanismos de supresión tumoral. En el caso de un anti-idiotipo que remeda un antígeno carbohidratado permiten mimetizar a antígenos tumorales no peptídicos como los gangliósidos que *per sé* resultan poco inmunogénicos, generando una fuerte respuesta humoral y celular en el huésped. B) **Técnicas:** los anti-idiotipos pueden ser producidos en grandes cantidades a menores costos. Los ensayos rea-

lizados hasta el momento con racotumomab han mostrado que es capaz de inducir una respuesta inmune específica dando muestras de actividad terapéutica con una baja respuesta tóxica, incluso ante una re-inmunización repetida<sup>20</sup>.

Previamente a este estudio de Fase I, se realizó un estudio para la determinación inmunohistoquímica de la expresión de gangliósidos N-glicolilados en muestras tumorales del Banco de Tumores del Hospital Garrahan<sup>24</sup>. El NeuGc-GM3 ha sido descrito en tumores sólidos como carcinoma de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas y melanoma, pero no es usualmente detectado en células humanas normales. Se estudiaron 27 muestras de neuroblastoma y de tumores de la familia del Sarcoma de Ewing. La presencia del gangliósido fue evidente en 23 de 27 casos estudiados (85%), con un promedio de 70% de células tumorales positivas. No se encontraron diferencias significativas en neuroblastoma con y sin amplificación de N-myc, sugiriendo esto que la expresión del gangliósido N-glicolil GM3 es conservada en tumores más agresivos.

El presente estudio ha evidenciado la expresión del gangliósido N-glicolil GM3 en una alta proporción de tumores neuroectodérmicos en pediatría, lo cual no había sido investigado hasta el momento, sugiriendo ser de utilidad potencial como target específico para la inmunoterapia<sup>24</sup>.

## CONCLUSIONES

El interés por la inmunoterapia contra el cáncer está incrementando diariamente. Las mayorías de las terapias son aún experimentales y con mayor experiencia en adultos. De todas formas, los primeros estudios en inmunoterapia en pediatría ya han sido publicados.

Existe muy buena evidencia de que muchos niños con neuroblastoma presentan respuesta inmune contra su tumor. Aunque estas respuestas inmunes espontáneas son generalmente débiles y fallan en controlar el crecimiento tumoral, tienen el potencial de ser manipuladas para proporcionar una terapia altamente específica contra el neuroblastoma. A través de las últimas décadas, muchos enfoques de inmunoterapias diferentes han surgido, pero solo un pequeño número de estos han alcanzado el nivel de estudios clínicos con ocasionales respuestas clínicas importantes, proporcionando pruebas de que el sistema inmune puede, si es adecuadamente manipulado, controlar y erradicar el tumor.

Las terapias actuales convencionales han probado ser inadecuadas para tratar la enfermedad avanzada en el neuroblastoma. Estudios preclínicos han ampliado nuestro conocimiento sobre la respuesta inmune en estos tumores y guiaron la optimización de posibles inmunoterapias dirigidas en forma de anticuerpos, vacunas, citoquinas y terapias celular-

res. Sin embargo, basada en la moderada respuesta anti tumor de las terapias individuales discutidas, el éxito futuro de la inmunoterapia contra el neuroblastoma incluiría combinar estas modalidades de tratamiento y aplicarlos en el grupo de enfermedad mínima residual. El desafío para la próxima década sería trasladar los resultados de los tratamientos pre clínicos en tratamientos efectivos para pacientes y hacer que estos tratamientos estén disponibles en países en desarrollo. Esto requiere superar los muchos obstáculos que se presentan en la conducción de los estudios clínicos de los nuevos agentes biológicos en los niños. Además, formas innovadoras de incorporación de los ensayos de nuevas inmunoterapias en protocolos de tratamiento de alto riesgo debe ser hallado con el fin de hallar su potencial terapéutico.

## Agradecimientos

El Dr. David Ballon realizó las ilustraciones de este capítulo. La Dra. Claudia Sampor es Becaria clínica del Proyecto de Investigación preclínica y desarrollo clínico de vacunas oncológicas. FONCYT. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Llevada adelante en el Servicio de Hemato-Oncología del Hospital Garrahan. Subsidios: PID-PAE 129 e Instituto Nacional del Cáncer.

## REFERENCIAS

1. Cancer infantil. [http://www.msal.gov.ar/inc/ciudadanos\\_cinfantil.php](http://www.msal.gov.ar/inc/ciudadanos_cinfantil.php).
2. Inmunoterapia: Diccionario de cancer del Instituto Nacional del Cancer, de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos. <http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=45729>.
3. Navid F, Armstrong M and Barfield RC. Immune therapies for Neuroblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2009 May; 8(10): 874-882.
4. Wayne AS, Capitini CM and Mackall CL. Immunotherapy of childhood cancer: from biologic understanding to clinical application. *Hematology and oncology* 2010, 22:2-11.
5. Schientiger A., Philip M., Schreiber H. Specificity in cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2008 Oct;20(5):276-85. Epub 2008 Aug 5.
6. Gray JC and Kohler JA. Immunotherapy for Neuroblastoma: Turning promise into reality. *Pediatric Blood Cancer* 2009 DOI 10.1002/pbc.
7. Modak, S. and N. K. Cheung (2007). Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest* 25(1): 67-77.
8. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2009;27:1007-1013.
9. Yu AL., Gilman A. L., Ozkaynak M. F, London W. B., Kreissman S.G., Chen H. L., Smith M., Anderson B., Villablanca J. G., Matthay K., Shimada H et al. Anti-GD2 Antibody GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma, *N Engl J Med* 2010; 363:1324-1334.
10. Weijtens ME, Willemsen RA, Valerio D, Stam K, Bolhuis RL. Los linfocitos T humanos redirigidos genéticamente por Ig/gama de cadena simple producen citoquinas, específicamente células tumorales líticas y reciclan la capacidad lítica. *J Immunol* 1996 Jul 15;157(2):836-43.
11. Maris JM. Recent advenles in Neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202-11.
12. Frost JD, Hank JA, Reaman GH, Frierdich S, Seeger RC, Gan J, et al. Ensayo fase I/IB de anticuerpo anti-GD2 monoclonal murino 16.G2a más interleuquina 2 en niños con neuroblastoma refractario: un informe del Children's Cancer Group. *Cancer* 1997 Jul 15;80(2):317-33.

13. Negrier S, Michon J, Floret D, Bouffet E, Gentet JC, Philip I, et al. Células asesinas activadas por interleuquina 2 y por linfoquinas en 15 niños con neuroblastoma metastático avanzado. *J Clin Oncol* 1991 Aug;9(8):1363-70.
14. Jacobs J.F.M., Coulie P. G., Frigdor C. G., Adema G.J., de Vries I. J. M. and Hoogerbrugge P. M. Targets for active immunotherapy against pediatric solid tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Jun;58(6):831-41. Epub 2008 Nov 14.
15. Cheung NK, Kushner BH, Cheung IY, Kramer K, Canete A, Gerald W, et al. Tratamiento con anticuerpos anti-G(D2) de neuroblastoma mínimo residual en etapa 4 a una edad de más de 1 año. *J Clin Oncol* 1998 Sep;16(9):3053-60.
16. Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Tsui CC, Gillies SD, Reisfeld RA, et al. Ensayo fase I de un anticuerpo ch14.18 monoclonal anti-disialogangliósido quimérico humano-murino en pacientes con neuroblastoma refractario y osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1998 Jun;16(6):2169-80.
17. Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Schrappe M, et al. Ensayo fase I de un anticuerpo GD2 ch14.18 anti-disialogangliósido quimérico humano-murino en pacientes con neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31A(2):261-7.
18. Oliva, J. P., Z. Valdes, et al. (2006). Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat* 96(2): 115-21.
19. Guthmann, M. D., M. A. Castro, et al. (2006). Cellular and Humoral Immune Response to N-Glycolyl-GM3 Elicited by Prolonged Immunotherapy With an Anti-Idiotypic Vaccine in High-Risk and Metastatic Breast Cancer Patients. *J Immunother* 29(2): 215-223.
20. Fernandez LE, Gabri MR, Guthmann MD, Gomez RE, Gold S, Fainboim L, Gomez DE and Alonso DF. NGcGM3 ganglioside: a privileged target for cancer vaccines. *Clinical and Developmental Immunology* 2010, Article ID 814397, 8 pages doi: 10.1155/2010/814397.
21. Malykh, Y.N., R. Schauer, et al. (2001). N-glycolilneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* 83 (7): 623-34.
22. Hernandez A.M., Rodriguez N., et al. Anti- NeuGcGM3 Antibodies, Actively Elicited by Idiotype Vaccination in Non-small Cell Lung Cancer Patients, Induced Tumor Cell Death by and Oncosis-Like Mechanism. *The Journal of Immunology* 2011, March; 186:3735-3744.
23. Kelly RJ., Gulley J.L., Giaccone G. Targeting the Immune System in Non-Small-Cell Lung Cancer: Bridging the Gap Between Promising Concept and Therapeutic Reality. *Clinical Lung Cancer* 2010 July; 11(4):228-37.
24. Scursoni, A. M., L. Galluzzo, et al. Detection of N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Neuroectodermal Tumors by Immunohistochemistry: An Attractive Vaccine Target for Aggressive Pediatric Cancer. *Clinical and Developmental Immunology* 2011 July.