

Candidato vacunal contra el virus de papiloma humano: alternativa para el tratamiento de tumores cervico-uterinos

✉ Isis del Carmen Torrén¹, Osmany Mendoza¹, Osvaldo Reyes¹, Aileen Batte¹, Milaid Granadillo¹, Luis E Fernández², Gerardo Guillén¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 190 y 158, AP 6162, CP 10 600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: isis.torrens@cigb.edu.cu

²Centro de Inmunología Molecular, CIM
Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, PO Box 16040, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN

Este artículo trata una temática de actualidad y gran importancia en el campo de la inmunoterapia del cáncer: la obtención de una vacuna contra tumores provocados por el virus de papiloma humano tipo 16 (VPH16). A pesar de que en el mundo existen algunas vacunas terapéuticas contra el VPH en ensayos clínicos, hasta el momento ninguna ha recibido su aprobación. La novedad de este resultado consiste en el diseño de una vacuna original, basada en un péptido sintético correspondiente a la secuencia mínima de un epitopo CTL (del inglés *cytotoxic T lymphocyte*) del antígeno tumoral de origen viral (E7) adyuvado con VSSP (del inglés *Very Small Size Proteoliposome*; desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular). La prueba de concepto en el modelo murino tumoral de VPH16 demostró que el tratamiento de los ratones con este candidato vacunal indujo células T CD8⁺ específicas contra el antígeno E7, la regresión completa de tumores y un aumento significativo en la sobrevivencia de los ratones. Este constituye el primer reporte que describe que la inmunización terapéutica con un péptido CTL restringido y VSSP induce la regresión de tumores y representa el primer ejemplo de inmunoterapia de cáncer basada en el uso de VSSP con un antígeno viral. Los resultados han sido objeto de invención, y se han divulgado en varios eventos internacionales y en la revista *Vaccine* (Torrén I, Mendoza O, Batte A, Reyes O, Fernández LE, Mesa C, et al. Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. *Vaccine* 2005;23:5768-74).

Introducción

El cáncer cervical es la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. El virus del papiloma humano (VPH), en particular el tipo 16 (VPH16), está asociado con el cáncer cervical. Más del 99% de los cánceres cervicales y sus lesiones precursoras contienen ADN del VPH. Las proteínas oncogénicas E6 y E7 son importantes en la inducción y mantenimiento de la transformación celular y son co-expresadas en la mayoría de los cánceres cervicales que contienen VPH. Por lo tanto, estas proteínas oncogénicas representan antígenos diana ideales para el desarrollo de vacunas y estrategias inmunoterapéuticas contra tumores asociados a este virus [1].

En los últimos años, se han ensayado con varias vacunas que contienen péptidos de unión al complejo de histocompatibilidad principal clase I (MHC-I) en pacientes con enfermedades progresivas asociadas al VPH y otros tipos de tumores. Sin embargo, los resultados no han sido alentadores debido a que la inducción de la respuesta de las células T es muy débil y, por tanto, el beneficio clínico ha sido irrelevante.

Existen varios estudios en los que se describen diferentes estrategias para resolver la falla de estas vacunas peptídicas en la inducción de una potente inmunidad sostenida; pero estos esfuerzos aún son insuficientes.

La novedad de este resultado consiste en el diseño de una vacuna original, basada en un péptido sintético correspondiente a la secuencia mínima de un epitopo reconocido por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL, del inglés *cytotoxic T lymphocyte*) de un antígeno tumoral de origen viral que, combinado con proteoliposoma de muy pequeño tamaño (VSSP, del inglés

Very Small Size Proteoliposome; adyuvante desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular) [2] y en ausencia de componentes oleosos, induce una potente respuesta de células T contra tumores establecidos.

En ese sentido, el trabajo estuvo dirigido a demostrar la hipótesis de que este tipo de vacuna peptídica, combinada con un adyuvante completo, incrementa sus propiedades inmunogénicas y anticancerígenas. Por este motivo, los hallazgos son de gran originalidad y constituyen un enfoque novedoso en el desarrollo de vacunas terapéuticas con perspectivas para el tratamiento del cáncer [3]. Estos resultados han sido objeto de invención [4].

El trabajo consistió en varias etapas: síntesis química del péptido CTL, establecimiento del modelo murino TC-1 y demostración de la expresión de la proteína E7 del VPH-16 en las células TC-1 y en los tumores de los animales, evaluación en un escenario profiláctico de la protección contra el reto tumoral de los animales inmunizados con el candidato vacunal, evaluación después de un segundo reto tumoral, evaluación en el escenario terapéutico de la regresión completa de tumores establecidos, evaluación de la sobrevivencia de los animales tratados con el candidato vacunal, y evaluación de la inmunogenicidad del candidato vacunal mediante ensayos de ELISPOT y ELISA de interferón gamma.

Resultados

Síntesis química del péptido CTL

El péptido seleccionado para la prueba de concepto fue un epitopo CTL con restricción H2-D^b en rato-

1. Granadillo M, Torrén I. Human papillomavirus vaccines: current status and perspectives. *Biotechnol Apl* 2008; 25:XX.

2. Mesa C, De León J, Ringley K, Fernández LE. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine* 2004;22:3045-52.

3. Torrén I, Mendoza O, Batte A, Reyes O, Fernández LE, Mesa C, et al. Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. *Vaccine* 2005;23:5768-74.

4. Torrén M, Guillén G, Pajón R, Reyes O, Fernández LE inventores; CIGB solicitante. Composiciones farmacéuticas que contienen antígenos del virus de papiloma humano. AR045815 (A1). 2005 Nov 16.

nes, correspondiente a los aas. del 49 al 57 de la oncoproteína E7 del VPH16 (RAHYNIVTF), el cual se denominó E7(p).

La síntesis química del péptido E7(p) se realizó en fase sólida, seguido de purificación a más del 95% por cromatografía líquida de alta presión. La identidad del péptido se determinó por espectrometría de masas, mediante la técnica de ionización por electro-nebulización.

El péptido se conservó liofilizado a 4 °C. Justo antes de su administración, se disolvió a 1 mg/mL en agua de inyección. Posteriormente se mezcló 50 µg de E7(p) con 160 µg de VSSP (referidos a cantidad de proteína) en un volumen de 0.2 mL, y de esta manera la dosis de preparación vacunal E7(p)+VSSP estuvo lista para ser administrada a los animales.

Establecimiento del modelo tumoral murino TC-1. Demostración de la expresión de la proteína E7 de VPH-16 en células TC-1 y en los tumores de los animales

Se utilizó el modelo murino TC-1, consistente en ratones C57BL/6 inmunocompetentes retados con células tumorales TC-1. La línea de células tumorales TC-1, que expresa la proteína E7 de VPH16, se deriva de un cultivo primario de células de pulmón de ratones C57BL/6 que fueron inmortalizadas y transformadas con los genes E6 y E7 de VPH16 y un gen humano c-Hras activado [5]. La línea tumoral fue cortésmente provista por el Dr. T.C Wu (The John Hopkins Medical Institute, Baltimore, Md., EE.UU.), y este modelo ha sido ampliamente utilizado en la prueba de concepto de varios preparados vacunales desarrollados en diferentes laboratorios del mundo.

Para su establecimiento en nuestro laboratorio, se realizaron diferentes acciones: (i) singenización de la línea tumoral con los ratones C57BL/6 proveídos por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB); (ii) comprobación de la expresión de la proteína E7 de VPH16 a partir de células y tumores aislados de los ratones mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa, y Western blot; y (iii) experimentos repetidos de inoculación de tumores, seguido del análisis de prendimiento de los tumores y la obtención de resultados homogéneos y repetitivos.

Evaluación en el escenario profiláctico de la protección contra el reto tumoral de los animales inmunizados con el candidato vacunal

En este primer ensayo, se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea en el flanco derecho con dos dosis cada 14 días. Siete días después de la segunda inmunización, se retaron los ratones por inyección subcutánea en la pata posterior derecha del animal con 5×10^4 células de la línea tumoral TC-1. Además del grupo inmunizado con el candidato vacunal E7(p) + VSSP, se incluyeron tres grupos controles en el estudio: VSSP, E7(p) + adyuvante incompleto de Freund (IFA) y solución salina de tampón fosfato (PBS; del inglés *Phosphate Buffered Saline*). Los resultados indican la protección de los ratones inmunizados con el candidato vacunal contra el reto tumoral ($P < 0.0001$) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del procedimiento de tumores en los ratones inmunizados

Grupo	Prendidos / Total	Tratamiento
I	10/10	50 µg E7(p) + IFA
II	2/10	50 µg E7(p) + VSSP
III	10/10	VSSP
IV	10/10	Placebo (PBS)

Evaluación después de un segundo reto tumoral

Para conocer la longevidad de la respuesta inmune al VPH, se seleccionaron cinco animales sobrevivientes del experimento anterior inmunizados con E7(p)+ VSSP, los cuales se retaron por segunda ocasión (2×10^5 células TC-1) por vía subcutánea en la pata posterior izquierda a 50 días de su primer reto tumoral. Como control del experimento se incluyó un grupo de cinco ratones vírgenes del mismo lote de animales, que fueron expuestos al mismo reto tumoral. Los resultados indicaron el 100% de protección contra el prendimiento de tumores en los ratones vacunados, mientras que en el grupo control todos los ratones presentaron tumores medibles a los 21 días de la observación.

Evaluación en el escenario terapéutico de la regresión completa de tumores establecidos

En el escenario terapéutico, los ratones se inocularon primeramente con 2×10^5 células TC 1. A los 10 días de la implantación de las células tumorales, el 100% de los ratones presentaron tumores subcutáneos medibles, con volúmenes de 400 a 500 mm³. Después de distribuirlos aleatoriamente en diferentes grupos, se les administraron dos dosis del preparado vacunal espaciadas 14 días entre sí. Después de un período de observación de 50 días, cuando la incidencia de los tumores en los ratones tratados con E7(p) + IFA, VSSP y PBS era del 100%, la terapia con E7(p) + VSSP produjo regresión tumoral en el 100% de los ratones (Figura 1a).

Evaluación de la sobrevida en los animales tratados con el candidato vacunal

Para determinar los efectos de la terapia con E7(p) + VSSP en la sobrevida, se observaron los ratones tratados por un período de 100 días. El gráfico de Kaplan-Meier (Figura 1b) muestra los resultados de

5. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky H, August JT, Pardoll DM, et al. Treatment of established tumors by a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56:21-6.

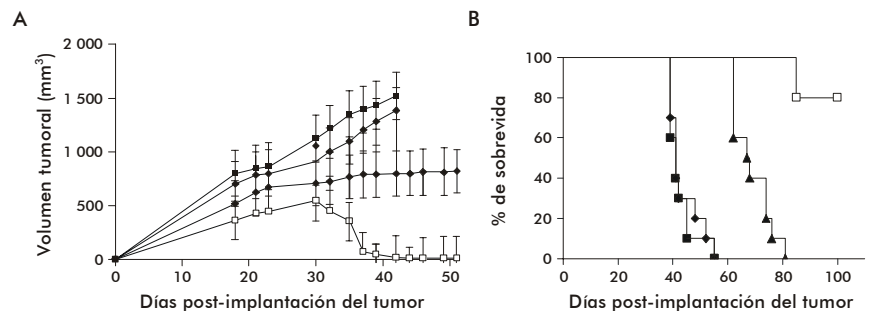


Figura 1. Inmunización terapéutica con E7(p) + VSSP induce regresión de tumores TC-1 y aumento de sobrevida. (A) Ratones C57BL/6 (10 por grupo) se inocularon con 2×10^5 células TC-1 en la pata posterior derecha. A los 10 y 24 días de la implantación del tumor, los ratones se inmunizaron con PBS (■), VSSP (◆), E7(p) + IFA (▲), y E7(p) + VSSP (□). El volumen tumoral se midió durante 50 días. **(B)** Durante 100 días se observaron los ratones y se analizó su sobrevida.

la sobrevida, que en el grupo tratado con E7(p) + VSSP fue del 80% (8/10) a los 100 días, y cuyo resultado fue muy significativo estadísticamente con relación a los grupos tratados con E7(p) + IFA, VSSP y PBS ($P < 0.0001$).

Evaluación de la inmunogenicidad del candidato vacunal mediante ensayos de ELISPOT y ELISA de interferón gamma

Como una etapa inicial en la identificación de los mecanismos efectores asociados a la eliminación del tumor, se caracterizó la respuesta inmune inducida por la inmunización con E7(p) + VSSP mediante un ELISA de citocinas. Para comparar la respuesta inmune mediada por CTL E7 específicos en los diferentes grupos vacunados, se desarrolló el ensayo de ELISPOT anti-IFN- γ . Las células de bazo de ratones inmunizados con E7(p) + VSSP secretaron altos niveles de IFN- γ como respuesta a la estimulación con el péptido y bajos niveles de IL-10, lo que es indicativo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1. El número de células de bazo secretoras de IFN- γ fue mayor en los ratones inmunizados con E7(p) + VSSP, lo que sugiere la inducción de una respuesta CD8⁺ T citotóxica (Figura 2).

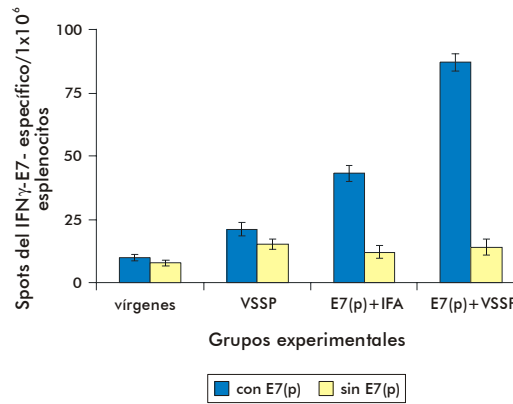


Figura 2. Demostración de inducción de precursores de células T CD8⁺ específicas contra E7 en ratones C57BL/6 inmunizados con varios inmunógenos, mediante el ensayo de ELISPOT IFN- γ . Los ratones (tres por grupo) se inmunizaron dos veces con VSSP, E7(p) + IFA, E7(p) + VSSP y otros permanecieron vírgenes. Los esplenocitos de cada ratón se aislaron 7 días después de la última inmunización. El número de precursores de células T específicas a E7 que producen IFN- γ se determinó en presencia (columnas sólidas) y ausencia (columnas abiertas) de E7(p).