

Inducción de ablación androgénica e inhibición de tumores hormonosensibles de próstata mediante inmunización con el péptido sintético GnRHm1-TT adyuvado con VSSP

✉ Jesús A Junco¹, Roberto Basulto¹, Franklin Fuentes¹, Eddy Bover¹, María D Castro¹, Osvaldo Reyes², Eulogio Pimentel¹, Lesvia Calzada¹, Yovisleidis López¹, Ricardo Bringas², Niurka Arteaga¹, Héctor Hernández¹, Hilda Garay², Luis Agüero¹, Gerardo Guillén²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey
Ave. Finlay y Circunvalación Norte, CP 70100, Camagüey, Cuba

²Centro 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: jesus.junco@cigb.edu.cu

Introducción

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres en el hemisferio occidental [1]. En Cuba, esta constituye un importante problema de salud y la mortalidad supera los 2 000 casos anuales. La supresión androgénica mediante el uso de análogos de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), constituye una de las intervenciones terapéuticas más eficaces para esta entidad, y el uso de vacunas a base de esta hormona, representa una promisoriosa alternativa para estimular el sistema inmunológico debido al uso de adyuvantes potentes [2], y al menor costo. Estas vacunas han sido evaluadas solo en unos pocos Ensayos Clínicos, con modestos resultados de baja inmunogenicidad, fenómenos de supresión epitópica generados por las moléculas portadoras y un limitado efecto terapéutico [3].

En este trabajo se describe el diseño y síntesis de una nueva molécula derivada de la GnRH; y su utilización como principio activo principal en un inmunógeno, que tiene como acción fundamental: provocar una ablación de la testosterona, y por tanto; la inhibición del crecimiento de tumores prostáticos hormonosensibles. La alternativa vacunal propuesta tiene como principio activo fundamental, un péptido mimético de la GnRH, denominado GnRHm1-TT. En este péptido, la glicina de la posición 6 se cambió por una prolina, para aumentar la rigidez de la molécula, y en el mismo proceso de síntesis se le unió el epitopo T cooperador del toxoide tetánico (TT), lo que de conjunto le confiere una mayor inmunogenicidad. El péptido GnRHm1TT sintetizado [4], es preparado en forma de emulsión oleosa, que incluye entre sus componentes el inmunopotenciador VSSP (proteoliposoma de muy pequeño tamaño, del inglés *Very Small Size Proteoliposome*) [5]. La inclusión de este inmunopotenciador genera una respuesta inmunológica más potente y duradera, demostrándose por primera vez su utilidad en la inducción de respuesta inmune contra péptidos autólogos del tipo de la GnRH. En consecuencia, la inmunización con el péptido adyuvado generó niveles significativos de anticuerpos neutralizantes de la hormona, que se correlacionaron con la reducción significativa de los niveles de testosterona hasta la castración, y del tamaño y peso de los testículos y próstata, en cerdos, perros, monos y ratas ($p < 0.01$). En este último modelo, la inmunización con el candi-

dato vacunal mencionado, demostró una inhibición del crecimiento de un tumor hormonosensible de próstata en ratas implantadas con el tumor Dunning R3327-H y aumentó en 2 veces, la sobrevida de los animales inmunizados. Finalmente, a través de un ensayo *in vitro* de inhibición de inositol fosfato (IP), se demostró que la actividad biológica fundamental del péptido GnRHm1-TT en los animales inmunizados, está mediada por la generación de anticuerpos neutralizantes de la hormona GnRH endógena. Estos resultados unidos a estudios preclínicos realizados en animales sanos e implantados con tumor, han permitido la autorización del uso de este inmunógeno en un Ensayo clínico Fase I en pacientes con cáncer de próstata.

Análisis de los resultados

Diseño y síntesis de la molécula GnRHm1-TT

La molécula GnRHm1-TT es una variante mimética de la GnRH-I de mamíferos, la cual ha sido modificada a través de la sustitución de la glicina de la posición 6 por una prolina en el proceso de síntesis química, con la adición del epitope cooperador de células T del TT 830-844. (PCT WO 98/27111)[4]. La secuencia de esta molécula es presentada en la Figura 1.

Primeros resultados en cerdos pre-púberes

La utilidad de usar el péptido GnRHm1-TT como potente inmunógeno inductor de ablación de testosterona e inmunocastración fue ensayada por primera vez en cerdos prepúberes de la raza Landrace. Estos recibieron 2 inmunizaciones con 1 mg de péptido GnRHm1-TT emulsificado en ACF, espaciados de forma bimensual. Como resultado, se obtuvo una disminución significativa de la talla y el peso de los testículos ($p < 0.001$), próstata ($p < 0.01$), vesículas seminales ($p < 0.01$), y

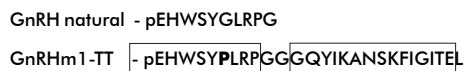


Figura 1. Estructura primaria de la molécula LHRH/GnRH natural y del péptido GnRHm1-TT. Se resalta el cambio de prolina por glicina en la posición 6, y las unidades peptídicas correspondientes a la GnRH y el epitope cooperador de células T proveniente de la toxina tetánica (TT).

1. Labrie F, Dupont A, Belanger A, St-Arnaud R, Giguere M, Lacouciere Y, et al. Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocrinol Rev* 1986;7:67-74.
2. Talwar GP. Vaccines for control of fertility and hormone-dependent cancers. *Immunology and Cell Biology* 1997;75:184-9.
3. Schutze MP, Leclerc C, Jolivet M, Audibert F, Chedid L. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J Immunol* 1985;135:2319-22.
4. Bringas R, Basulto R, Reyes O, de la Fuente J. Vaccine for the reversible immunocastration of mammals. International application published under the patent cooperation treaty (PCT). Int. publ. no. WO 98/27111. 1998 Jun 25.
5. Mesa C, De León J, Rigley K, Fernández LE. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria Meningitidis*: an effective adjuvant for dendritic cell activation. *Vaccine* 2006, (24) S2/42S2/43.

en consecuencia, de los niveles de testosterona hasta cifras de castración (0.05 nmol/mL). A esto se sumó una disminución significativa en la capacidad eréctil de los cerdos inmunizados, así como de sus reflejos y capacidad de apareamiento. Esta constituye la primera prueba de concepto, donde se describe la efectividad del péptido diseñado en un modelo animal [6]. En la tabla se incluyen algunos de estos resultados.

Resultados en perros Beagles adultos

Los resultados positivos obtenidos con la inmunización de animales prepubers, fue exitosamente repetible en el modelo perros Beagles adultos sanos. Para ello, se aplicó un esquema de inmunización similar al practicado en cerdos y el mismo tipo de adyuvante, lográndose niveles significativos de anticuerpos contra la hormona GnRH natural. Los niveles de anticuerpo anti GnRH generados, en el caso de los perros machos, provocaron una disminución del número de espermatozoides y un incremento en la aparición de espermatozoides con deformaciones. Adicionalmente, se produjo una disminución en el tamaño de la luz de los epidídimos y la invasión de estos por tejido intersticial, lo cual conllevó a la esterilidad en los animales inmunizados y ocasionó lesiones severas en la arquitectura de la próstata de los animales inmunizados [6].

Resultados en ratas adultas sanas

La aparición de signos de toxicidad por el uso del adyuvante completo de Freund, el modesto efecto encontrado en los órganos diana y la dificultad de encontrar en el perro un buen modelo para cáncer de próstata, fueron factores que estimularon la búsqueda de un nuevo modelo para los estudios preclínicos diseñados en función de aumentar la inmunogenicidad sobre la base del número de inmunizaciones y el esquema de inmunización; así como en la utilización de un nuevo tipo de adyuvante, que permitiera ser utilizado en humanos y que tuviera un efecto similar a los obtenidos con los adyuvantes completo e incompleto de Freund.

Los primeros ensayos realizados en ratas adultas sanas se llevaron a cabo utilizando 3 dosis (100, 300 y 750 µg) de GnRHm1-TT adyuvados en Montanide ISA 51 en tres esquemas de inmunización diferentes (semanal, quincenal y mensual). Se evidenció que la dosis 750 µg indujo mayores niveles de anticuerpos anti-GnRH con la consiguiente disminución de los niveles de testosterona cuando este fue administrado en un esquema mensual o quincenal por ese orden. A su vez, en correspondencia con la sero-conversión y los niveles de castración se produjo en las ratas bajo estas condiciones, una atrofia completa de la próstata, los testículos y las glándulas accesorias. En este estudio,

dosis inferiores a 750 µg del péptido GnRHm1-TT mostraron baja inmunogenicidad, y en concordancia no se indujo la atrofia observada con la dosis máxima en los animales inmunizados.

Efecto inmunopotenciador del uso de VSSP en ratas adultas sanas inmunizadas con el péptido GnRHm1-TT

Encontrados el esquema de inmunización y la dosis de GnRHm1-TT que producían una significativa inmunogenicidad utilizando el péptido adyuvado en Montanide ISA 51, se consideró introducir el inmunopotenciador VSSP para optimizar la respuesta inmune contra la hormona GnRH y por tanto para potenciar su efecto. Para ello se tuvieron en cuenta los reportes de otros autores [7, 8] y los resultados previos referidos a la respuesta inmunológica y la homogeneidad del efecto sobre los órganos diana cuando se utiliza este método para inmunizar mamíferos.

Como resultado, la inclusión de las VSSP como componente acompañante del péptido GnRHm1-TT aumentaron significativamente los títulos de anticuerpos contra la hormona nativa, y en particular, la velocidad de seroconversión y su efecto sobre los órganos diana (próstata y testículos). ($P < 0.01$) (Figura 2).

Inhibición del crecimiento tumoral e incremento de la sobrevivencia en ratas implantadas con un tumor prostático hormonosensible al ser terapéuticamente inmunizadas con GnRHm1-TT

Una vez demostrada la capacidad inmunocastradora y atrofiante de la próstata y testículos que producía el péptido sintético en presencia de VSSP y del adyuvante Montanide ISA 51 en animales sanos, fue obligatorio comprobar estos resultados en un modelo animal de cáncer de próstata. Para ello, se emplearon animales implantados con una línea tumoral de cáncer de próstata murina sensible a la terapia hormonal. Como resultado de la inmunización de ratas implantadas con la línea de cáncer de próstata murino Dunning R3327-H, a pesar de la presencia del tumor, el 90% de los animales desarrolló títulos de anticuerpos contra la GnRH. Estos niveles de anticuerpos fueron suficientes para disminuir los valores de testosterona hasta valores de castración. Así mismo, se demostró una correlación directa entre los niveles de castración y la inhibición del crecimiento tumoral, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo placebo. Adicionalmente, se observó que el grupo de los animales inmunizados y castrados tuvieron una supervivencia de aproximadamente el doble que los animales placebos.

6. Basulto R, Milanes C, Rojas A, Fuentes F, Izquierdo N, Bertot JA, Hernández H, Sánchez D, Calzada L, Junco J. Efectos de la inmunización contra GnRH sobre la estructura y función testicular en perros adultos. *Biotecnol Apl* 2003;20:20-4.

7. Finstad CL, Wang CY, Kowalsky J, Zhang M, Li M, Li X, Xia W, Bosland M, et al. Synthetic luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) vaccine for effective androgen deprivation and its application to prostate cancer immunotherapy. *Vaccine* 2004;22:1300-13.

8. Ghosh S, Jackson DC. Antigenic and immunogenic properties of totally synthetic peptide-based anti-fertility vaccines. *Int Immunol* 1999;11:1103-10.

Tabla 1. Comparación de los niveles de testosterona y del peso de los testículos, próstata, glándulas bulbouretrales y otras glándulas accesorias del aparato reproductor masculino en cerdos inmunizados con el péptido sintético GnRHm1-TT, emulsionado en adyuvante completo de Freund

Grupo Experimental	No. de cerdos	Próstata	Vesículas seminales	Glándulas bulbouretrales	Epidídimos	Testículos	Testosterona (nmol/L)
GnRHm1-TT	5	0.12 ± 0.08**	1.32 ± 2.06*	2.79 ± 3.78*	3.88 ± 2.75*	7.43 ± 7.65**	0.05 ± 0.03**
Control	5	0.56 ± 0.30	4.22 ± 2.72	6.54 ± 2.96	7.36 ± 0.92	21.1 ± 4.54	17.63 ± 2.71

*Diferencia estadísticamente significativa con un intervalo de confianza del 95%.

**Diferencia estadísticamente significativa con un intervalo de confianza del 99%.

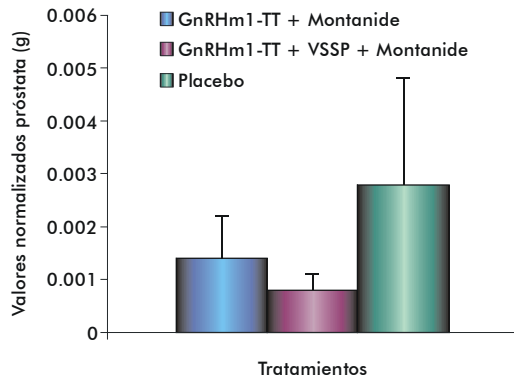


Figura 2. La administración de 4 inmunizaciones en ratas adultas sanas con el péptido sintético GnRHm1-TT mezclado con VSSP y adyuvado con Montanide ISA 51.

A pesar de la castración sostenida en los animales inmunizados y castrados, hubo un pequeño número de animales en ambos grupos cuyo tumor creció aún en ausencia de testosterona, lo cual sugiere un comportamiento similar en el modelo tumoral utilizado con respecto al que experimenta el cáncer de próstata en el hombre.

Inhibición de la producción de Inositol fosfato por anticuerpos neutralizantes de la GnRH endógena mediante inmunización con GnRHm1-TT

El diseño del péptido GnRHm1-TT, así como su forma de administración, fueron concebidos para explotar las capacidades inmunológicas de este péptido como vacuna. Ya se conocía la capacidad de unión de los anticuerpos generados por el preparado vacunal al péptido GnRH natural adsorbido a una placa de poliestireno y su correlación con los niveles de castración, no obstante era necesario dilucidar la capacidad inmunoneutralizante de los anticuerpos contra el GnRHm1-TT adyuvado de la manera anteriormente descrita, sobre la GnRH natural. Para ello, se desarrolló

un experimento de inhibición en células COS-7 transformadas con el receptor de GnRH, mediante el uso de GnRH a una concentración de 10^{-9} M. Con $12.5 \mu\text{g}$ de anticuerpos anti-GnRH se obtuvo una inhibición completa de la producción de IP, con el consiguiente y casi total secuestro de la GnRH presente en el medio celular. No obstante, este péptido administrado en ausencia de adyuvante y del inmunopotenciador VSSP mostró capacidad de unión a receptores promiscuos presentes en células tumorales prostáticas de la línea Dunning R3327-G y otros tejidos.

Ensayos toxicológicos de GnRHm1-TT. Autorizo del comienzo de un estudio clínico Fase I en pacientes con cáncer de próstata localmente avanzado

La utilización del péptido GnRHm1-TT mezclado con VSSP y adyuvado en Montanide ISA 51, evaluado en pruebas de tolerancia aguda, local, y a dosis repetidas, mostró la inocuidad de este preparado. Estos resultados, junto a las evidencias de acción biológica efectiva en los modelos preclínicos descritos, permitieron presentar al Centro para el Control de los Medicamentos en Cuba (CECMED) el expediente para estudio clínico fase I en pacientes con cáncer de próstata localmente avanzado, el cual aprobado.

Conclusiones

La inmunización con la variante peptídica GnRHm1-TT diseñada, emulsificada con VSSP en un adyuvante oleoso, produce títulos significativos de anticuerpos contra la hormona GnRH endógena, que guardan un alto nivel de correlación con la ablación de testosterona, la disminución del tamaño de los órganos diana (testículos y próstata) y la inhibición del crecimiento de tumores hormonosensibles de próstata en modelos murinos. La presentación de los resultados preclínicos in vivo e in vitro obtenidos con la emulsión del péptido GnRHm1-TT, permitió la autorización de su uso como formulación vacunal en un ensayo clínico Fase I, en pacientes con cáncer de próstata avanzado.