

# **Gangliósidos N-acetil y N-glicolil GM3. Estrategia para soportar la plataforma VSSP en vacunas contra el cáncer**

## **Autoría principal**

**Ma. del Carmen Rodríguez Montero<sup>1</sup>.**

## **Otros autores**

**Miguel López López<sup>1</sup>, Jose A. Ruiz Garcia<sup>1</sup>, Raine Garrido Arteaga<sup>1</sup>, Mayra Reyes Moreno<sup>1</sup>, José A. González Lavaut<sup>1</sup>, Janet Lora<sup>1</sup>, Denia González<sup>1</sup>, Vicente Vérez Bencomo<sup>1</sup>.**

## **Colaboradores**

Ing. Julia Ma. Gutierrez<sup>1</sup>, MSc. Bertha Guillen<sup>1</sup>, M.Sc. Layda González<sup>1</sup>, Dr. Mercedes Rodríguez<sup>2</sup>, Dr. Luis Enriquez Fernández<sup>3</sup>, Dr. Adriana Carr<sup>3</sup>.

## **Entidad ejecutora principal**

<sup>1</sup>Centro de Química Biomolecular (CQB).

## **Entidades participantes**

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química CUJAE.

<sup>3</sup>Centro de Inmunología Molecular (CIM).

## **Autor para correspondencia**

M.Sc. Ma. del Carmen Rodríguez Montero.

Centro de Química Biomolecular, BioCubaFarma, Ave 21 esq. 200, Atabey, La Habana.

Tel: 2713994. E-mail: maria.carmen@cqb.cu

## **Aporte científico de cada autor al resultado**

- ✓ **M.Sc. Ma. del Carmen Rodríguez Montero (20%):** Este Investigadora y Sub directora de Operaciones Industriales del CQB. Asumió la gerencia de este proyecto desde la fase inicial de investigación hasta su actual fase productiva. Diseñó el primer esquema de síntesis del gangliósido y participó de la primera síntesis del mismo. Es además, co-autor de los principales artículos científicos y los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico que sustentan la propuesta de Premio.
- ✓ **Dr. Miguel López López (10%):** Este autor es Investigador del CQB. Contribuyó y asesoró científicamente la investigación y el diseño de la estrategia de síntesis de ambos gangliósidos debido a su reconocida experiencia en el campo de la síntesis química. Es co-autor de los artículos internacionales.
- ✓ **Dr. Jose A. Ruiz Garcia (10%):** Este autor es Investigador y Jefe del Laboratorio de Desarrollo Síntesis del CQB. Contribuyó directamente con el desarrollo del proceso de síntesis para hacer del mismo un proceso escalable. Es co-autor de uno de los artículos nacionales y los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico presentados.
- ✓ **Dr. Raine Garrido Arteaga (10%):** Es Investigador y Jefe del Grupo de Análisis del CQB. Contribuyó y asesoró científicamente el diseño de la estrategia analítica del control de la calidad de ambos gangliósidos. Es además, autor parte de los artículos científicos

presentados y los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico presentados.

- ✓ Dr. **Mayra Reyes Moreno** (10%): Es Investigadora y Jefe del Grupo de Producción del Gangliósido sintético. Contribuyó directamente con la organización y diseño del sistema productivo del gangliósido sintético y sus intermedios. Es autor de uno de los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico presentados.
- ✓ Dr. **José A. González Lavaut** (10%): Es Investigador y Director de Producción del CQB. Contribuyó directamente con la organización y diseño del sistema productivo del gangliósido natural. Es además co-autor de dos de los artículos científicos y de los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico presentados.
- ✓ M.Sc. **Janet Lora** (10%): Es Investigadora y Directora de Calidad del CQB. Contribuyó directamente con el diseño y establecimiento de las especificaciones de calidad de los gangliósidos. Es co-autor de uno de los artículos nacionales presentados.
- ✓ MSc. **Denia González** (10%): Es profesora de la Fac. de Ingeniería Química de la CUAJE. Contribuyó directamente con el desarrollo y escalado del proceso de síntesis de uno de los intermedios del gangliósido sintético. Es autor de uno de los artículos nacionales presentados.
- ✓ Dr. **Vicente Vérez Bencomo** (10%): Ha participado en la concepción de la estrategia y de todas las fases del proyecto desde sus inicios. Es co-autor de los principales artículos presentados.

## Resumen

La plataforma VSSP (del inglés: very small size proteoliposomes), desarrollada por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) en colaboración con otras instituciones de la Biotecnología cubana consiste en una nano partícula que se auto asocia cuando se unen componentes de la membrana del meningococo con glicolípidos del tipo gangliósido. La nano partícula obtenida es un potente estimulante del sistema inmune y ha demostrado un gran potencial en la inmunoterapia del cáncer. La combinación de cada antígeno tumoral con VSSP constituye un producto potencial, de los cuales varias están en fase de desarrollo clínico por el CIM y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La estrategia para el desarrollo de estas vacunas pasa por contar con las cantidades necesarias y con la calidad adecuada de los gangliósidos N-acetil y N-glicolil GM3. El Centro de Antígenos Sintéticos de la Universidad de la Habana asumió esta tarea a mediados de los años 2000. Posteriormente ya en el CQB esta tarea se convirtió en la principal amenaza de los proyectos VSSP de la década pasada. El Centro de Química Biomolecular desde su creación asumió integralmente esta tarea. Para eso se partió de un procedimiento de extracción y purificación a partir de eritrocitos, que tenía rendimientos muy bajos, además del riesgo potencial de utilizar sangre de origen animal en su producción. El enfoque integral consistió en a) consolidar esta producción a partir de su escalado b) elaborar un procedimiento para obtener el gangliósido sintético c) establecer un sistema de calidad que incluyera las especificaciones del producto final d) establecer un puente entre las características de los gangliósidos obtenidos por una u otra vía e) Garantizar el suministro de decenas de gramos anuales f) desarrollo de un soporte analítico físico-químico. La tecnología actual ha permitido obtener 91 gramos de N-acetil GM3 natural, 121 g de N-glicolil GM3 natural y 66,75 g N-acetil GM3 sintético algo que solo tiene como precedente la

obtención del antígeno sintético del *Haemophilus influenzae* tipo b en Cuba. Los productos han permitido realizar los desarrollos farmacéuticos, las evaluaciones biológicas y continuar los ensayos clínicos. Los resultados se incluyen en 6 publicaciones científicas referenciadas en la Web de la Ciencia. Esta investigación fue la base de la defensa de tres Tesis de Maestría en Química y varias tesis de diploma y trabajos de curso de estudiantes de ingeniería, licenciatura química y técnicos medios, la presentación en eventos científico-técnicos internacionales y nacionales que incluye el Premio en el Fórum de Ciencia y Técnica.

## **Comunicación Corta**

### **Introducción**

Los tratamientos contra el cáncer empleados hasta el momento, cirugía, radioterapia, quimioterapia, muchas veces no son suficientes y además resultan muy traumáticos para el paciente. Por tanto, encontrar nuevas formas de tratamiento, más efectivas y menos traumáticas, ayudaría a mejorar la calidad de vida de los portadores de esta enfermedad. Las células cancerosas presentan frecuentemente una glicosilación aberrada, especialmente manifestada en la expresión de distintos tipos de ácidos siálicos en glicolípidos y glicoproteínas. Como la mayoría de los antígenos asociados a tumores (TACA) representan un incremento de la expresión de lo propio, no son muy inmunogénicos. Por esta razón se han desarrollado diversas estrategias para incrementar la inmunogenicidad de TACAs y lograr potentes vacunas contra el cáncer. Entre estas estrategias están las VSSP formadas por la dispersión de proteínas bacterianas hidrofóbicas en soluciones de los gangliósidos N-glicolil GM3 o N-acetil GM3. A partir de esta tecnología se encuentran en distintas fases de estudios clínicos, tanto en el CIM como en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), varios candidatos vacunales contra el cáncer e inmunopotenciadores del CIM para indicaciones del cáncer y VIH SIDA. Basados en el conocimiento de que el gangliósido N-glicolil GM3 se encuentra sobreexpresado en las células tumorales de cáncer de mama<sup>1</sup> y no en el resto de los tejidos humanos, este antígeno se convirtió en un objeto de investigación para la inmunoterapia de este tipo de cáncer<sup>2</sup>. Por la naturaleza de las VSSP los gangliósidos componentes son una pieza clave. Estos gangliósidos se encuentran en bajas concentraciones en los eritrocitos equinos o caninos respectivamente, por lo que el CIM diseñó un procedimiento para su extracción y purificación a partir de los mismos. El procedimiento de laboratorio establecido en el CIM fue transferido al CQB en el año 2008 y a partir de esa fecha ha sido un objetivo escalar este proceso de manera que fuera posible disponer de decenas de gramos del producto y garantizar la continuidad de los ensayos clínicos. Pero, debido a las estrictas regulaciones mundiales existentes para el empleo de fármacos obtenidos a partir de sangre de origen natural, el CIM solicitó que se analizara la posibilidad de obtenerlos por síntesis química, teniendo en cuenta que de esta forma se obtendrían productos puros y de estructura definida, además de incrementar la capacidad productiva. El procedimiento tecnológico para la obtención de cada gangliósido constituye actualmente un Know-How del Centro de Química Molecular. Como resultado, desde entonces se ha mantenido un suministro creciente al CIM de ambos gangliósidos obtenidos a partir de fuentes naturales, se estableció un procedimiento de laboratorio para obtenerlos por vía sintética, posteriormente fue estudiado su desarrollo

hasta disponer de un proceso escalable y en la actualidad se dispone de una tecnología para su producción del N-acetil GM3 por síntesis química. Con los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 entregados el CIM ha mantenido la producción de ambas VSSP y está desarrollando estudios de comparabilidad entre los gangliósidos naturales y sintéticos de manera que se logre el registro con la vacuna obtenida a partir del gangliósido sintético.

### Discusión y Resultados Obtención de N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 a partir de eritrocitos caninos y equinos respectivamente.

Los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3, son entidades moleculares definidas. En su estructura química que se muestra debajo, se puede apreciar que la misma está compuesta por tres unidades: una unidad de ácido siálico, enlazada en posición  $\alpha(2 \rightarrow 3)$  a una unidad de lactosa que a su vez está unida con estereoquímica  $\beta$  a una doble cadena lipídica (ceramida) cuya longitud en el ácido graso oscila entre 20 y 26 átomos de carbono según un estudio químico-físico practicado al productos. La diferencia entre el N-acetil GM3 y el N-glicolil GM3 consiste en la sustitución de un hidrógeno del grupo metilo en la porción N-acetilada por un grupo hidroxilo ( $\text{CH}_2\text{OH}$  en lugar de  $\text{CH}_3$  en el contexto del trisacárido).

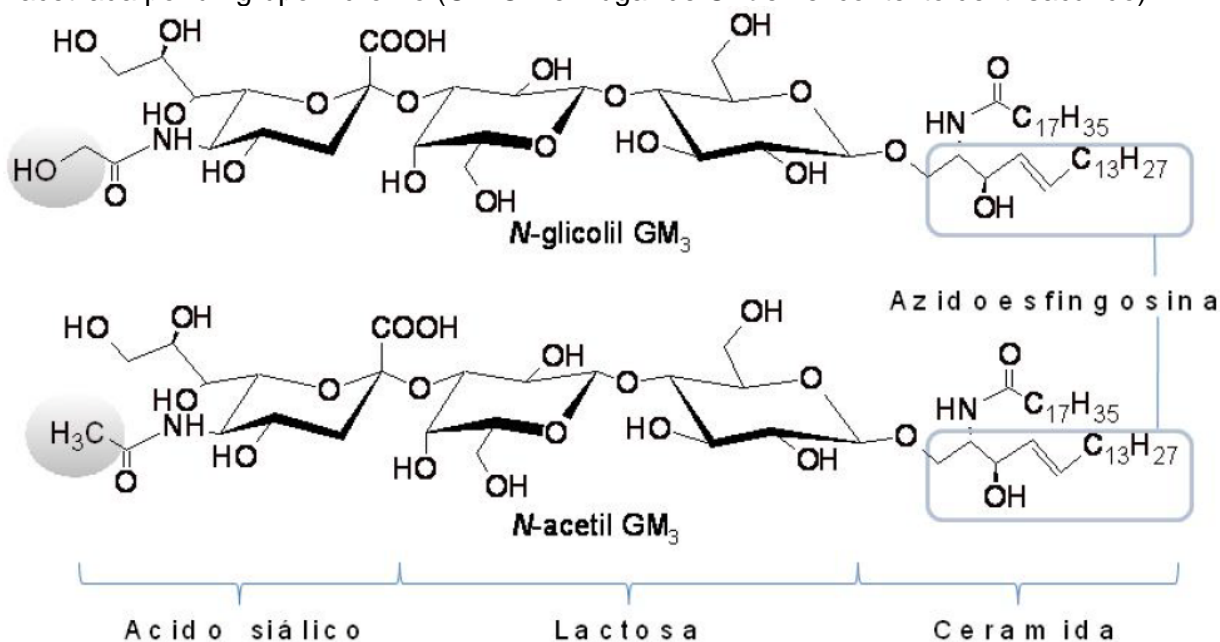


Fig. 1. Estructura del N-glicolil GM3 y N-Acetil GM3.

El proceso de obtención de estos gangliósidos a partir de eritrocitos caninos y equinos consiste en realizar extracciones con una mezcla de cloroformo/metanol a temperatura y agitación controladas, seguido de la precipitación de proteínas, extracción con disolventes, eliminación de sales mediante diálisis saponificación y dos purificaciones cromatográficas, la primera por adsorción-desorción utilizando Cromatografía Líquida de Alta Presión Preparativa y la segunda por Intercambio Iónico seguida de procesos purificativos de diálisis y liofilización<sup>4</sup>. El proceso de laboratorio transferido por el CIM al CQB en el 2008 fue escalado en el 2012 hasta 50L lo que permitió procesar lotes que rinden como promedio 1,25g de N-acetil GM3 y 1,75g de N-glicolil GM3. Durante ese período se efectuaron varios estudios que permitieron incrementar los volúmenes

de procesamiento y que constituyen cambios tecnológicos aprobados por el Sistema de Gestión de Calidad implementado en el centro, basado en los requisitos de la Regulación 16/2006 del CECMED que establece un Sistema de Control de Cambios que asegure la notificación, investigación, documentación y aprobación de cambios y constituyen actualmente Know-How del Centro de Química Molecular. La principal limitante de este proceso productivo es la garantía de suministro de la materia prima eritrocitos, que en el caso del N-glicolil GM3 se resolvió importándolos de Argentina. Desde el 2009 hasta principios del 2014, que se tomó la decisión de dejar de producir el N-acetil GM3 por la vía de la fuente natural, se procesaron 72 lotes que rindieron en total 91,0 g. Esta decisión se tomó debido a las dificultades para garantizar la materia prima con la calidad requerida y a que las cantidades obtenidas permitían concluir los estudios de comparabilidad química y biológica con el sintético para sustituirlo.

En el caso del N-glicolil GM3 los estudios de comparabilidad entre el natural y el sintético se están comenzando, por lo que la producción y entrega al CIM se basa en la tecnología de extracción y purificación a partir de eritrocitos equinos. Se han procesado desde el 2009 hasta la fecha 117 lotes que suman 121,4 g de producto. Solo se han obtenido y entregado pequeñas cantidades del sintético; se prevé que a partir del 2015 debe aumentar la demanda del mismo y por consiguiente sus niveles de producción.

#### **Establecimiento de las especificaciones de calidad del N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 natural.**

Los controles de calidad realizados por el CIM y transferidos al CQB incluían ensayos para evaluar la identidad y pureza, pero no contemplaban la totalidad de las posibles impurezas, contenidas en el gangliósido, ni la naturaleza de las mismas. Para establecer las nuevas especificaciones que garantizaran la calidad de ambos gangliósidos se realizó un estudio analítico que sirvió de base a un análisis posterior de las impurezas potenciales que acompañan al producto, considerando su vía de obtención. En el caso del N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 obtenidos por extracción y purificación de eritrocitos equinos y caninos respectivamente, se ampliaron las especificaciones de calidad, sustituyéndolas por otras más abarcadoras en la caracterización físico-química, para el cumplimiento de los requisitos identidad, pureza y contenido de impurezas. Las técnicas empleadas fueron: RMN 1H y HPTLC para evaluar la identidad y pureza, respectivamente. Para determinar el contenido de impurezas se aplicó Cromatografía de Capa Delgada (CCD) revelando con ninhidrina, para otros lípidos, colorimetría (Lowry) para proteínas y RMN 1H para los residuales químicos del proceso. De los estudios realizados por espectrometría de Masas (MALDI-TOF) para conocer a profundidad la composición lipídica (mezcla de ácidos grasos unidos a la esfingosina) se logró detectar la presencia de un ácido graso con dos insaturaciones como uno de los componentes minoritarios. Estos estudios sirvieron de base a la decisión de cual ácido graso debía constituir el componente del gangliósido sintético. Bajo esas especificaciones de calidad se han liberado la totalidad de los lotes procesados y entregados al CIM desde el 2009.

#### **Síntesis del N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 y sus intermedios.**

El esquema de síntesis de estos gangliósidos se basa, considerando su estructura, en la obtención de tres intermedios: un donante de ácido siálico, un aceptor de lactosa y la fracción ceramida que se ensamblan para dar lugar al producto deseado. Para la síntesis del aceptor se parte de la Lactosa y a través de 3 reacciones químicas se llega al derivado deseado<sup>5,6</sup>. Se optimizaron las condiciones de reacción de la primera etapa y se propuso eliminar dos purificaciones cromatográficas sustituyéndolas por extracciones líquido-líquido y sólido-líquido para obtener el derivado con la calidad requerida. En el caso del donante, se parte del ácido siálico y en 3 reacciones y una purificación se obtiene el donante acetilado. Si el gangliósido a obtener es el N-glicolil GM3, es necesario realizar 5 reacciones y una purificación más<sup>7</sup>. Para introducir la porción ceramida en la molécula la estrategia se basa en obtener el benzoato de la azidoesfingosina partiendo de galactosa, en una secuencia de 8 reacciones y una purificación<sup>8</sup> y posteriormente en el ensamblaje introducir la segunda cadena lipídica. Se diseñó un procedimiento que elimina de la secuencia dos pasos de purificación cromatográfica y optimiza las condiciones de reacción, lo que permitió aumentar la escala de producción a 10L.

Una vez obtenidos los tres intermedios se procede a realizar el ensamblaje<sup>6</sup>. Para ello primeramente se obtiene en 5 reacciones y dos pasos de purificación, el trisacárido donante con la estereoquímica adecuada, convenientemente protegido y activado. Seguidamente se realiza la glicosilación del benzoato de la azidoesfingosina con el trisacárido donante, el grupo azida del glicósido obtenido se reduce y el aminoglicósido resultante se acila con ácido esteárico para introducir la segunda cadena lipídica. Por último se eliminan los grupos protectores de la molécula y se purifica el producto. El procedimiento propuesto vía lactona<sup>9</sup> permite utilizar esta función como grupo protector durante toda la secuencia de síntesis. Al ser la primera vez que la [1→4] lactona es empleada como grupo protector, la mayoría de los derivados obtenidos en la secuencia son sintetizados por primera vez. El procedimiento presenta como ventaja además el empleo de la mezcla anhídrido acético/yodo en la reacción de peracetilación y en la desacetilación acetato de amonio/DMF, lo que simplifica considerablemente el proceso al no requerirse la purificación cromatográfica de los productos obtenidos. El procedimiento propuesto se realiza actualmente a escala de 10 L y permite obtener 14 g de producto por lote, lo cual satisface la necesidad de este producto en la fase actual de ensayos clínicos.

### **Estudio de comparabilidad del N-acetil GM3 natural con el sintético**

El objetivo de los estudios de equivalencia fue demostrar mediante el empleo de las técnicas analíticas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-1H), Espectrometría de Masas (MALDI-TOF) y la técnica de cromatografía de capa delgada (CCD), que los gangliósidos obtenidos por síntesis química son equivalente a sus similares extraídos y purificados de eritrocitos equinos en el CQB. Estos estudios de caracterización química se aplicaron a 3 lotes de gangliósidos sintéticos que fueron comparados con un lote de su homólogo natural.

### **Establecimiento de las especificaciones de calidad del gangliósido sintético N-Acetil GM3**

En el caso del producto obtenido por síntesis química las técnicas empleadas fueron: RMN y HPTLC para evaluar la identidad y pureza, respectivamente y se definieron

límites de aceptación por RMN  $^1\text{H}$  para reactivos y disolventes residuales. Se efectuaron los estudios de estabilidad química necesarios para definir el tiempo de vida útil de estos compuestos que aun continúan para prolongar su vigencia. Bajo esas especificaciones de calidad se han liberado la totalidad de los lotes procesados y entregados al CIM desde el 2011.

**Conclusiones** En este trabajo se describieron los principales resultados de algunos años de investigación, desarrollo y producción dirigida a la obtención y evaluación de la calidad de los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 para su uso en la obtención vacunas contra el cáncer basadas en la plataforma VSSP; el aporte del trabajo radica en haber garantizado el suministro de los mismos de manera que no se detuvieran los ensayos clínicos en curso, haber desarrollado un procedimiento para la síntesis de carbohidratos de elevada complejidad estructural, el desarrollo de las especificaciones de calidad de ambos gangliósidos obtenidos tanto a partir de fuentes naturales como sintéticas y la demostración de que los gangliósidos obtenidos por síntesis química eran químicamente equivalentes a los obtenidos por vía natural. Mediante el empleo de esta metodología, se han obtenido y liberado 72 lotes (91,0 g) de N-Acetil GM3 natural; 117 lotes (121,4 g) de N-glicolil GM3 natural y 38 lotes (66,5 g) de N-Acetil GM3 sintético, todos disponibles en la formulación de las vacunas terapéuticas correspondientes.

## Referencias

- [1] Kregel, Ute et col. Structure and Molecular Interactions of a Unique Antitumor Antibody Specific for N-Glycolyl GM3. *J. Biol. Chem.* 2004, Vol.279, No. 7, 5597-5603.
- [2] Oliva, Juan P. et col. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using 14f7 monoclonal antibody labeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , *Breast cancer Research and Treatment*. 2006 No. 96, 115-121. 10
- [3] Garrido R., Veloso R.C., López M., Labaut J.A., Rodríguez M.C., Vélez H., et al. Evaluation and Evidences of Natural Gangliosides with Two Unsaturated Bonds in the Ceramide Structure by Combination of MALDI-MS and NMR. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 400(10): 3675-81
- [4] Wen-Qi, W., Ander Gustafson. *Acta Chemica Scandinavica*. 1995, Vol. 49, 929-93.
- [5] Baer H.H., Abbas S.A., *Carbohydrate Research*. 84, 53-60, 1980
- [6] Richard I. Duclos. The total synthesis of ganglioside GM3. *Carbohydrate Research* 2000; No. 328, 489–507
- [7] A.A. Sherman, et al. *Carbohydrate Research* 337 (2002) 451–457
- [8] Schmidt, R.R., Zimmermann, P., Synthesis of D-erythro-esfingosines. *Tetrahedron Letters*, 1986, No. 27, 481-484.
- [9] Regalado A, Mesa M, Chávez D, González R, Monteserín L, Rodríguez M.C, Tolón B, Veloso R.C, Garrido R, Fernández V, Vérez V, López M. A New and Efficient Approach to Prepare N-acetyl GM Ganglioside Via Trisaccharide [1→4] Lactone. *Organic Process Research & Development*. 2013;17 (1):53–60