



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Desarrollo de un nuevo inmunopotenciador para uso humano:
Estudio preclínico y dilucidación de sus mecanismos de acción

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. JAQUELYNNE BRENDA CERVANTES TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA, HOSPITAL
DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

CIUDAD DE MEXICO, AGOSTO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

A las Dras. Edda Sciutto Conde y Gladis Fragoso, ambas por compartir durante tantos años sus conocimientos y brindarme su apoyo y confianza.

Al Dr. Constantino López Macías, miembro de mi comité tutorial por todo el aporte científico brindado para la realización del trabajo.

A la MVZ Georgina Díaz, MVZ Jorge Omar García Rebollar y MVZ Mónica Martínez Marcial MVZ por su apoyo técnico en la reproducción, manejo y cuidado de los animales de experimentación.

A la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, por el apoyo para el desarrollo del trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido en la otorgación de la beca para realizar mis estudios (Registro de becas 25243, 28818).

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos:

CONACyT Ciencia Básica número 253891 “Estudio de los mecanismos moleculares que median la actividad inmunopotenciadora del péptido GK-1”.

CONACyT FINNOVA número 224525 “Estudio preclínico del péptido GK-1 sintético para su uso como inmunopotenciador en humanos”.

PAPIIT número IG200414 “Desarrollo de un nuevo inmunopotenciador sintético para uso humano: estudio preclínico del péptido GK-1 y evaluación de los mecanismos moleculares que median su capacidad adyuvante”.

PAPIIT número IN213219 “Evaluación de las propiedades antitumorales de la inmunoterapia basada en la administración del péptido adyuvante GK-1”

DEDICATORIAS

A mis grandes amores RENÉ, VALERIA Y RENATA, quienes han llenado de alegría mi vida y me dan toda la fuerza para seguir esforzándome cada día para ser mejor persona.

A mi madre SONIA, quien sin su apoyo incondicional este logro personal simplemente no hubiera sido posible. Además, por ser la mejor mamá, abuela y amiga de quien siempre hemos aprendido a dar amor incondicional, por ser el mejor ejemplo de honestidad y lucha constante. TE AMO inmensamente mami!

A mis hermanas KARLA y CHRIS, quienes también han sido cómplices para apoyarme en esta meta y demostrarme que a pesar de los momentos difíciles siempre estaremos juntas.

A Edda y Gladis, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por convertirse en mis mentoras y amigas.

A todos mis compañeros del laboratorio con quienes en los últimos años he tenido la oportunidad de compartir y lograr un grupo de trabajo formidable: Laura Montero, Diana Torres, Diana Herrera, Juan Alberto.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Inmunopotenciadores	3
2.1.1 Mecanismos de internalización de péptidos	5
2.1.2 Mecanismos de activación de inmunoestimuladores	7
2.1.3 Mecanismos de regulación de la señalización mediada por TLRs	8
2.1.4 Uso de inmunopotenciadores como adyuvantes	9
2.1.5 Uso de inmunopotenciadores en la respuesta antitumoral	10
2.2 Estudios preclínicos requeridos para inmunoestimuladores	11
2.2.1 Estudios de toxicidad	12
2.2.2 Estudios de genotoxicidad	14
3. ANTECEDENTES	
3.1 Identificación del péptido GK-1	15
3.2 Características fisicoquímicas de GK-1	16
3.3 Comportamiento de GK-1 como CPP	17
3.4 Características inmunogénicas de GK-1	19
4. HIPÓTESIS GENERAL	21
5. OBJETIVO GLOBAL	22
6. Identificación de los mecanismos de señalización asociados a la activación de células dendríticas inducidas por el péptido GK-1	
6.1 Hipótesis	22
6.2 Objetivo general	22
6.3 Objetivos particulares	22
6.4 Materiales y métodos	
6.4.1 Generación de células dendríticas a partir de médula ósea	22
6.4.2 Estimulación in vitro de BMDC para la evaluación de mecanismos de activación y señalización	23
6.4.3 Determinación de la activación de las BMDC	23
6.4.4 Evaluación de las vías de MAPK mediante Western blot	24
6.4.5 Evaluación del posible receptor de GK-1	25
6.4.6 Determinación in vivo de los niveles de citocinas	25
6.4.7 Evaluación de la capacidad de GK-1 para internalizarse en BMDC	26
6.5 Resultados	

6.5.1 Estudio del mecanismo de activación de células dendríticas derivadas de médula ósea mediado por el péptido GK-1	27
6.5.2 Activación de MAPK y NF-κB inducido por GK-1	28
6.5.3 Evaluación de la capacidad de GK-1 de internalizarse en BMDC	32
7. Evaluación de la seguridad preclínica del péptido GK-1 sintético	
7.1 Hipótesis	36
7.2 Objetivo general	36
7.3 Objetivos particulares	36
7.4 Materiales y métodos	
7.4.1 Estudio de toxicidad subcrónica	36
7.4.2 Estudio de genotoxicidad del péptido GK-1	38
7.4.2.1 Ensayo bacteriano de reversión de mutagenicidad	38
7.4.2.2 Ensayo in vivo de micronúcleos	38
7.4.2.3 Prueba de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos	39
7.5 Resultados	
7.5.1 Estudio de toxicidad subcrónico	39
7.5.2 Estudio de genotoxicidad	44
8. DISCUSIÓN	46
9. BIBLIOGRAFÍA	57
10. APÉNDICES	
I. Desarrollo y validación del método cromatográfico para la identificación y estudio de estabilidad del péptido GK-1	68
II. Artículos publicados durante el trabajo de tesis	87

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de entrada a las células de péptidos CPP	7
Figura 2. Papel de los TLRs en la interacción de la inmunidad innata y adquirida	8
Tabla 1. Activación de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo por diversos adyuvantes	10
Figura 3. Determinación del epítipo GK-1 en la secuencia del antígeno KETc7	17
Figura 4. Predicción <i>in silico</i> del comportamiento como CPP del péptido GK-1	18
Figura 5. GK-1 induce la activación de BM-DCs	28
Figura 6. GK-1 induce la fosforilación de las MAPKs p38 y ERK1/2 en BM-DC	29
Figura 7. GK-1 favorece la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B p65	30
Figura 8. GK-1 induce la producción in vivo de IL-6, IL-12, IL-15 y CCL2	31
Figura 9. GK-1 induce la producción de IL-6 in vivo dependiente de Myd88	31
Tabla 2. Niveles de citocinas inducidas en suero de ratones deficientes en Myd88 administrados con el péptido GK-1	32
Figura 10. Entrada del péptido GK-1 en células dendríticas dependiente de la concentración y energía	33
Figura 11. GK-1 entra en células dendríticas mediado por receptor	34
Figura 12. GK-1 entra en células dendríticas por mecanismo de endocitosis	35
Figura 13. Efecto de GK-1 en el peso de ratas en un estudio de toxicidad subcrónica	40
Tabla 3. Efecto del péptido GK-1 en los parámetros hematológicos (Ratas hembras)	41
Tabla 4. Efecto del péptido GK-1 en los parámetros hematológicos (Ratas machos)	41
Tabla 5. Efecto de GK-1 en la química sanguínea (Ratas hembras)	42
Tabla 6. Efecto de GK-1 en la química sanguínea (Ratas machos)	42
Figura 14. Estudio histopatológico del efecto de GK-1 sobre distintos órganos	43
Tabla 7. Efecto del péptido GK-1 en cepas mutantes de <i>S. typhimurium</i>	44
Tabla 8. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos y eritrocitos maduros	44
Tabla 9. Porcentaje de aberraciones cromosómicas	45

1. RESUMEN

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado la capacidad inmunomoduladora de un péptido sintético de 18 aminoácidos denominado GK-1. Este péptido es capaz de potenciar la respuesta inmune y la protección inducida por la vacuna de la influenza. Adicionalmente, se ha reportado su efecto antitumoral y antimetastásico en modelos murinos de melanoma y cáncer de mama, en los cuales la administración del péptido aumentó la supervivencia de los ratones afectados. Uno de los mecanismos que subyace en su efecto inmunomodulador es su capacidad para activar células presentadoras de antígeno (APC: células dendríticas y macrófagos) con el consecuente aumento en la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, lo que promueve una presentación más eficiente de antígenos específicos.

Este panorama señala la relevancia de avanzar en su estudio a fin de proponer su uso en humanos y ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen sus propiedades inmunomoduladoras.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos del estudio preclínico de toxicidad y los mecanismos moleculares asociados a la activación de células dendríticas (DC) por el péptido GK-1 que permiten avanzar sustancialmente en la generación de un producto de posible aplicación farmacéutica.

Los estudios realizados demuestran que GK-1 no induce efectos tóxicos posteriormente a su evaluación en un estudio de toxicidad subcrónico en dosis repetidas cuando se administra de forma subcutánea o endovenosa. Adicionalmente, GK-1 no muestra efectos genotóxicos ni mutagénicos que limiten su uso.

Al respecto de los mecanismos asociados a la capacidad inmunomoduladora de GK-1, en este trabajo se reporta que activa las vías de señalización de las MAP cinasas (MAPK) p38 y ERK1/2, así como la vía de NF- κ B a través de Myd88, lo que sugiere la participación de un receptor parecido a un TLR (por las siglas en inglés de Toll-like Receptor) como un posible receptor del péptido. Adicionalmente, se demostró que GK-1 se incorpora a las DC a través de un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina, lo que podría favorecer la activación de otras vías de señalización intracelulares.

ABSTRACT

During the past decade, our research group has provided substantial evidence indicating that GK-1, an 18-amino acid peptide, has important immunomodulatory properties

In our research group we have demonstrated the immunomodulatory capacity of an 18-aminoacid peptide named GK-1. It is capable to enhance the immune response and protection induced by the influenza vaccine. Additionally, its antitumor and antimetastatic effect has been reported in murine models of melanoma and breast cancer, in which the administration of the peptide increased the survival in tumor-bearing mice. One of the mechanisms underlying its immunomodulatory effect is its ability to activate antigen presenting cells (APC: dendritic cells and macrophages) with the consequent increase in the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, which promotes a more efficient presentation of specific antigens.

This panorama points the relevance of continuing its study in order to propose its human use and delve into the molecular mechanisms that underlie its immunomodulatory properties.

This work describes the results obtained from the preclinical study including the toxicity and pharmacodynamic studies, involving the molecular mechanisms associated with the activation of dendritic cells (DC) by the GK-1 peptide that allow the knowledge for the development of a product of pharmaceutical application.

The results show that GK-1 peptide does not induce toxic effects after evaluation in a repeated dose subchronic toxicity study when administered subcutaneously or intravenously. Additionally, GK-1 does not show genotoxic or mutagenic effects that limit its use.

Regarding the mechanisms associated with the immunomodulatory capacity of GK-1, in this work it is reported that it activates the signaling pathways of MAP kinases (MAPK) p38 and ERK1 / 2, as well as the pathway of NF- κ B through Myd88, suggesting the involvement of a Toll-like Receptor (TLR) receptor as a possible receptor for the peptide. Additionally, it was demonstrated that GK-1 is incorporated into DC through a clathrin-dependent endocytosis mechanism, which could favor the activation of other intracellular signaling pathways.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Inmunopotenciadores.

Los inmunopotenciadores o inmunoestimuladores son moléculas capaces de estimular la respuesta inmuno-inflamatoria [Reed et al., 2009]. Entre los inmunoestimuladores de origen biológico se encuentran citocinas, toxinas bacterianas, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por las siglas en inglés de pathogen associated molecular patterns) [Pichichero, 2008; Reed et al., 2009; Safari et al., 2011]. Los PAMPs son capaces de inducir una respuesta rápida mediante el reconocimiento a través de los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) [Janeway and Medzhitov, 2002]. La expresión diferencial de estos receptores codificados en la línea germinal (TLR, NLR (por las siglas en inglés de Nod-like receptor), RLR (por las siglas en inglés de Rig-like receptor, receptores tipo scavenger) permite responder ante un estímulo ejerciendo funciones de opsonización, activación del complemento, fagocitosis, activación de vías de señalización e inducción de apoptosis [Medzhitov, 2009; Tam and Jacques, 2014].

Los PAMPs se caracterizan por su habilidad de activar células del sistema inmune innato, entre ellas las células dendríticas; en consecuencia, favorecen la expresión de moléculas co-estimuladoras, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y la producción de distintos mediadores inflamatorios por medio de la activación diferenciada de distintas vías de señalización [Akdis et al., 2004; Li et al., 2007]. La activación de la respuesta inmune mediada por agonistas de TLRs ha permitido considerar el uso de los PAMPs como inmunoestimuladores con potencial como adyuvantes o en tratamientos como inmunoterapia contra diversas enfermedades [Banerjee and Gerondakis, 2007; Dong and Kobinger, 2013; Holbrook et al., 2016; Ohadian and Nowroozi, 2019]. Entre los PAMPs con potencial inmunoestimulador figuran el Monofosforil Lípido A (MPL), un agonista de TLR4 purificado del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella minnesota* R595 que incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias favoreciendo la inducción de una respuesta Th1 mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B [Pichichero, 2008; Lee and Nguyen, 2015]. Otras moléculas incluyen las porinas PorB de *Neisseria* [Burke et al., 2007], OmpC y OmpF de *Salmonella* [Moreno-Eutimio et al., 2013] y FomA de *Fusobacterium nucleatum* [Toussi et al., 2012], que se ha encontrado que son capaces de ejercer el efecto adyuvante a través de la señalización por TLR2 estableciendo una eficiente respuesta sistémica y de mucosas. Se ha descrito también que la flagelina, proteína principal en la estructura del flagelo de bacterias Gram-negativas, es reconocida extracelularmente por TLR5 e intracelularmente activa el inflammasoma compuesto por NLRC4 y NALP5 [Mizel and Bates,

2010; Zhao et al., 2011], aunque no se sabe si el inflamasoma contribuye a su papel como adyuvante. En general, la flagelina como adyuvante en vacunas genera una respuesta de anticuerpos robusta y una respuesta celular Th1/Th2 [Huleatt et al., 2007; Holbrook et al., 2016]. Por otro lado, se ha reportado que la profilina de *Toxoplasma gondii* es capaz de inducir la producción de IL-12, TNF e IL-6 en un mecanismo dependiente de la activación de NF- κ B mediada por la interacción con TLR11, esta respuesta se ha descrito también para profilinas de otros organismos [Yarovinsky et al., 2005]. El efecto adyuvante de la profilina de *Eimeria* al co-administrarse con antígenos de *T. gondii* aumentó también los niveles de IL-12 favoreciendo la inducción de las respuestas humoral y Th1 [Hedhli et al., 2009].

A pesar de que se ha demostrado la eficacia e inocuidad de la activación de diversos PAMPs como inmunoestimuladores, se ha considerado explorar el uso de ligandos de menor complejidad molecular, como los basados en secuencias peptídicas, considerando que se ha encontrado que son capaces de activar los mecanismos de la respuesta inmune de manera eficiente [Dong and Kobinger, 2013]. Entre éstos se encuentran el péptido ALTTE, derivado de una fimbria bacteriana de *P. gingivalis* que induce la expresión de IL-6, la activación de p38 y NF- κ B mediada por TLR2/CD14 [Asai et al., 2001; Ogawa et al., 2012] y el péptido FK-156 que produce la estimulación de NOD1 para generar una respuesta tipo Th2 [Werts et al., 2007]. De la misma forma se ha descrito el efecto adyuvante del complejo iónico IC31, que combina un péptido antibacteriano de 11 aminoácidos (KLKL₅KLK) y un oligonucleótido de origen sintético (ODN1a). El péptido KLKL₅KLK por si solo induce un perfil de citocinas de tipo Th2, mientras que con la combinación de la secuencia nucleotídica mencionada, produce una respuesta celular de tipo Th1 que se caracteriza por la presencia de altos niveles de IFN- γ mediado por la activación de las DC a través del receptor TLR9 [Olafsdottir et al., 2009]. Se ha descrito también el efecto adyuvante del péptido Hp91, cuya secuencia se encuentra en el dominio B-box de la alarmina de alta movilidad HMGB1 (por las siglas en inglés de High mobility group box 1 protein) y que es capaz de activar a las DC a través de la señalización mediada por TLR4 en un mecanismo dependiente de Myd88 (por las siglas en inglés de Myeloid differentiation primary response 88) que en consecuencia activa a la MAPK p38 y al factor de transferencia NF- κ B así como de un mecanismo independiente de Myd88, que conlleva a la activación de IRF3, favoreciendo la inducción de una respuesta Th1 [Messmer et al., 2004; Saenz et al, 2014]. Por otro lado, se han diseñado péptidos sintéticos derivados de péptidos antimicrobianos que permiten modular la respuesta inmune sin llevar a cabo una función antimicrobiana, los que se han denominado “innate defense regulators” (IDRs) [Yeung et al., 2011]. Algunos de estos IDRs incluyen a los péptidos derivados de la lactoferrina bovina (bLF) como son: 1) la lactoferrina B (LFcinB) liberada por la pepsina de la

región N1 terminal de la bLF durante su paso al intestino, 2) otras de origen sintético como la lactoferrampina (LFampin) y 3) una quimera de las regiones activas de bLF denominada LF quimera [Drago-Serrano et al., 2017; Acosta-Smith et al., 2018]. Todos estos IDR's derivados de bLF se ha visto que favorecen el reclutamiento y activación de las DC por lo que se han empleado como adyuvantes de la vacuna de la influenza [Sherman et al., 2015] y BCG [Hwang et al., 2009]. De igual forma, el péptido IDR-1002 derivado de la bactericina de neutrófilos bovinos ha mostrado inducir protección contra infecciones causadas por *S. aureus* y *E. coli* mediante la inducción de quimiocinas posteriormente a la señalización mediada por PI3K, p38, ERK1/2 y NF- κ B [Nijnik et al., 2010]. Se ha descrito también la activación eficiente de células presentadoras de antígeno mediante la interacción de la β -defensina HBD-3 con TLR1/TLR2 favoreciendo una respuesta Th1 [Kalenik et al., 2018]. El extracto leucocitario de origen humano (Transferon®) es una mezcla de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) [Medina-Rivero et al., 2016] que ha mostrado tener un efecto inmunomodulador en infecciones virales causadas por el virus herpes simple, en alergias y en procesos tumorales de cáncer de próstata, mediante un mecanismo que implica la activación NF- κ B en monocitos/macrófagos mediado por su interacción con TLR [Hernández-Esquivel et al., 2018; Jimenez-Urbe et al., 2019].

2.1.1 Mecanismos de internalización de péptidos

Una consideración importante en la modulación de la respuesta por péptidos deriva de la necesidad de que puedan ser internalizados para poder ejercer su función. Al respecto, se ha descrito la participación de péptidos pequeños capaces de promover el transporte de una variedad de moléculas a los que se les denomina "Cell Penetrating Peptides" (CPP), que son en su mayoría de naturaleza catiónica, anfipática o hidrofóbica [Brooks et al., 2010; Madani et al., 2011; Yeung et al., 2011]. El mecanismo mediante el cual entran a la célula puede estar dado por endocitosis o traslocación directa (Figura 1) [Madani et al., 2011]. Se ha propuesto que algunos CPP de origen catiónico como son los péptidos Tat (RKKRRQRR), penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK) y MPG (GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV) pueden atravesar la membrana mediante una vía independiente de energía, para lo cual se han propuesto como modelos la formación de micro-micelas y el paso directo a través de la bicapa lipídica [Madani et al., 2011]. La formación de micro-micelas requiere la interacción de altas concentraciones de CPP con los grupos cargados negativamente en las cabezas de fosfolípidos de la bicapa, lo cual genera una perturbación transitoria de la membrana. Esto es contrario a lo que sucede en la formación de poros, en donde se produce una desestabilización de la membrana debido a una acumulación de péptidos, produciendo así muerte celular [Lindgren and Langel, 2011]. Por otro lado, el mecanismo de paso directo a través de la membrana se ha descrito principalmente para

algunos CPP anfipáticos, en el cual se ha propuesto la formación transitoria de un poro o bien la interacción con los residuos hidrofóbicos de la membrana [Madani et al., 2011]. Entre los mecanismos de endocitosis más estudiados, en donde se requiere la presencia de un receptor en la superficie celular para favorecer la captura del péptido, se encuentra el dependiente de clatrin (Figura 1), el cual requiere de la GTPasa Dinamina-2, que es reclutada a hendiduras de la membrana plasmática cubiertas con clatrin y que a su vez interacciona con complejos de señalización como el de las MAPK mediante las proteínas β -arrestinas [Samaj et al., 2014; Mulcahy et al., 2014]. Entre algunos receptores asociados a este mecanismo de endocitosis para llevar a cabo transducción de señales se encuentran el receptor de tirosina cinasa (RTK por las siglas en inglés de Receptor Tyrosine Kinases) entre los cuales se encuentran los receptores VEGF-R y EGF-R, los receptores asociados a la proteína G (GPCR por las siglas en inglés G protein-coupled receptor), el receptor de la quimiocina CC7 (CCR7) y los TLRs [Wolfe and Trejo, 2007; Vercauteren et al., 2010; Juliano and Carver, 2015; Maritzen et al., 2015; Köberli et al., 2016]. Existen además otros mecanismos independientes de clatrin como los descritos para la catelicidina LL-37 e IDR-1002, que son capaces de ejercer su función inmunomoduladora posteriormente a ser internalizados en monocitos/macrófagos empleando receptores acoplados a la proteína G_i [Mookherjee et al., 2009; Nijnik et al., 2010; Sandgren et al., 2014]. Se ha reportado también el papel de las caveolas en la transducción de señales. Al respecto se ha descrito que la proteína caveolina 1 (CAV-1) interacciona con la forma inactiva de las proteínas G_α , Ras GTPasa y tirosina cinasas Src, las cuales se encargan de activar diversas vías intracelulares [Li et al., 1996; Ariotti et al., 2014]. Al respecto de la deficiencia de CAV-1 en fibroblastos embrionarios murinos, se ha reportado que la ausencia de esta proteína produjo una disminución de la segregación de la H-Ras GTPasa en la membrana plasmática interna y esto condujo a una disminución en la activación de la MAPK ERK no así en la activación mediada por la K-Ras GTPasa [Ariotti et al., 2014].

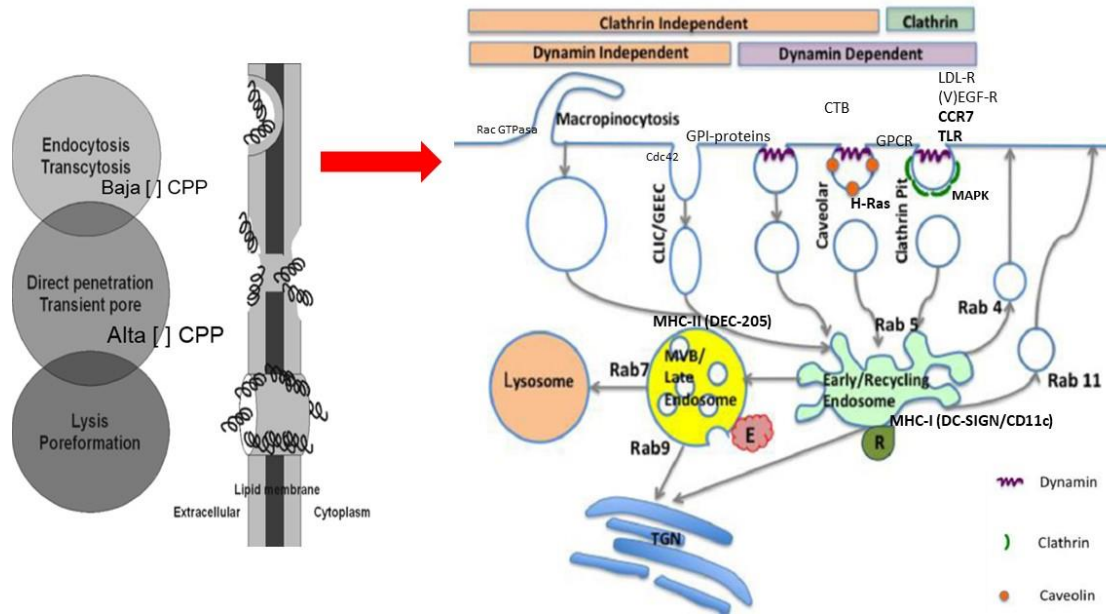


Figura 1. Mecanismos de entrada a las células de péptidos CPP (tomado y modificado de Lindgren and Langel, 2011)

2.1.2 Mecanismos de activación de inmunoestimuladores

El reconocimiento de ligandos de PRRs por su receptor desencadena la expresión de distintos genes de defensa del hospedero mediante la activación de diversas vías de señalización intracelulares que son un factor importante en la inducción de una respuesta eficiente en contra de procesos infecciosos y no infecciosos. La señalización en respuesta a la unión de un agonista con TLRs mediada por el adaptador Myd88 favorece la activación de los factores de transcripción NF- κ B, IRFs y AP-1 [Kawai and Akira, 2006], lo que resulta importante para la transcripción de genes de diversos mediadores inflamatorios tales como TNF- α , pro-IL-1, IL-6, iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico (NO)) y la citocina IL-12 entre otros, favoreciendo así el reclutamiento de células de la respuesta innata y la polarización de la respuesta inmune adaptativa (Figura 2) [Akira et al., 2001; Hedhli et al., 2009; Alfaro et al., 2013]. Además, se ha descrito la participación de los TLR/Myd88 en la activación de los linfocitos T (LT) foliculares, lo que favorece su interacción con los linfocitos B, promoviendo su maduración, diferenciación hacia células plasmáticas y producción de anticuerpos en centros germinales [Kubinak et al., 2015; Mosaheb et al., 2017; Shekarian et al., 2017]. La transducción de señales mediada por la activación de las vías de las MAPK permite regular diferencialmente diversas funciones celulares a través de la cooperación con otras vías de transducción de señales lo que permite la activación de diversos factores de transcripción tales como AP-1, STAT1 y NF- κ B [Chang and Karin, 2001, Zhang et al., 2005; Banerjee and Gerondakis, 2007].

Además de Myd88, existen otras proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR que pueden ser reclutadas después de la unión de un ligando con TLR como son las proteínas TRIF/TRAM [Kawai and Akira, 2006]. La señalización mediada por estos adaptadores conduce a la producción de interferones tipo I (α/β), así como la producción de citocinas inflamatorias de forma tardía mediante la activación de los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B, respectivamente [Akira and Takeda, 2004; Bagchi et al., 2007; O'Neill, 2009].

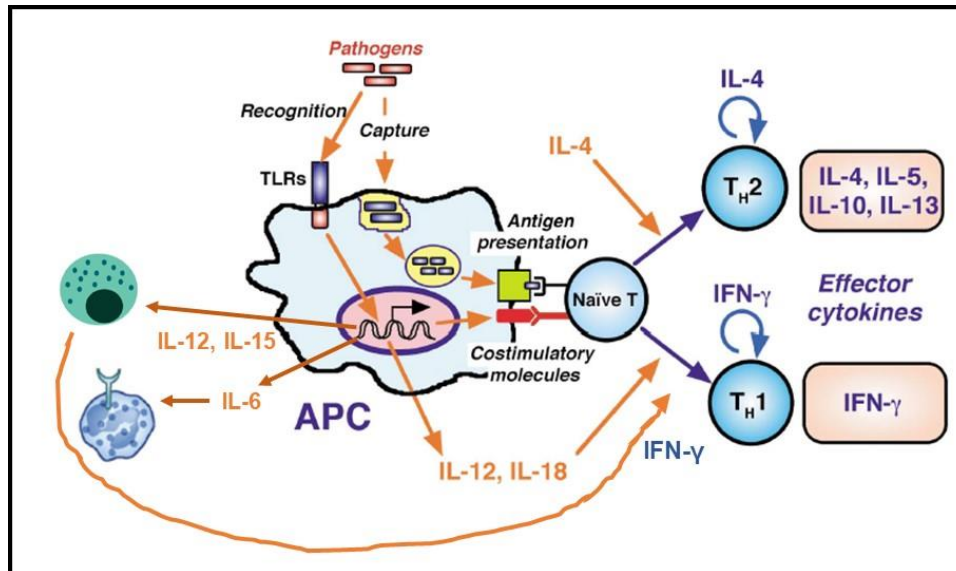


Figura 2. Papel de los TLRs en la interacción de la inmunidad innata y adquirida (Tomado y modificado de Akira et al., 2001).

2.1.3 Mecanismos de regulación de la señalización mediada por TLRs

La activación de los TLRs puede también conducir a la activación de otras moléculas intracelulares que permiten modular la respuesta inmune ante el estímulo. Tal es el caso de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) tipo IA, la cual interactúa con los TLRs 1, 2 y 6 a través del motivo YXXM o bien con el dominio YKAM en el extremo C-terminal de Myd88, lo que favorece la fosforilación de AKT activando a NF- κ B [Akira and Takeda, 2004; Peroval et al., 2013]. De la misma forma, ECSIT (de las siglas en inglés Evolutionarily Conserved Signalling Intermediate in Toll pathways) permite transducir la señal de los TLRs, ya que interacciona con TRAF6 y MEKK1, favoreciendo la fosforilación del complejo IKK. Existen otras moléculas como ST2L, SIGIRR, Tollip, IRAK-M, SOCS1 y Myd88s que se encuentran regulando negativamente la vía de señalización de TLR tras interactuar con algunos de los componentes de la vía [Akira and Takeda 2004; Lang and Mansell, 2007; Peroval et al., 2013]. ST2L y SIGIRR son proteínas transmembranales que contienen un dominio TIR capaz de interactuar con las proteínas adaptadoras Myd88/Mal o IRAK/TRAF-6, respectivamente, inhibiendo la activación de NF- κ B dependiente de Myd88 [Lang and Mansell, 2007]. Entre los reguladores intracelulares negativos

de la vía de TLRs se encuentra Myd88, que es una variante de Myd88 que carece del dominio intermedio y por lo cual evita el reclutamiento de IRAK-4 y la subsecuente fosforilación de IRAK-1 inhibiendo la activación de NF- κ B, pero no de JNK y AP-1. Se ha demostrado que la fosforilación de IRAK-1 y su unión a TRAF-6 es necesaria para la activación de NF- κ B, mientras que es prescindible para la activación de JNK posiblemente por un mecanismo alternativo de unión a IL-1R [Janssens et al., 2003; Lang and Mansell, 2007; Deguin and Barton et al., 2014]. Por su parte, IRAK-M es miembro de la familia de las cinasas IRAK catalíticamente inactivo que sólo se expresa en monocitos/macrófagos, evita la disociación de IRAK1/4 del complejo de señalización inhibiendo de esta forma la asociación de IRAK-1 con TRAF-6 [Suzuki et al., 2005; Lang and Mansell, 2007]. Se ha descrito también que la fosforilación-desfosforilación de Tollip regula la activación de NF- κ B. Por un lado, la forma desfosforilada interactúa con IRAK-1 disminuyendo su fosforilación; esta disminución induce un aumento en la fosforilación de Tollip produciendo la liberación de éste del complejo Tollip-IRAK-1 concluyendo así la regulación negativa de la vía [Lang and Mansell, 2007].

2.1.4 Uso de inmunopotenciadores como adyuvantes

A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos que median el efecto inmunomodulador de nuevas moléculas pocas han sido aprobadas por entidades regulatorias como la FDA para su uso en humanos (Tabla 1; <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/common-ingredients-us-licensed-vaccines>). En el caso de adyuvantes aprobados para uso humano, se han sumado al uso de las sales de aluminio (hidróxido y fosfato de aluminio), el empleo de sustancias oleosas tales como el MF59 (Novartis Vaccines and Diagnostics), el AS03 (GlaxoSmithKline Biologics), el AF03 (Sanofi), liposomas (Crucell) y más recientemente el AS04 (GlaxoSmithKline Biologics) que combina un agonista de TLR4 con alúmina [Coffman et al., 2010; Baldwin et al., 2012]. Asimismo, se ha sumado un agonista de TLR9, CpG 1018, un oligonucleótido sintético de 22 bases con motivos CpG [Campbell, 2017].

Sin embargo, algunos adyuvantes que han resultado eficientes experimentalmente no han logrado aprobarse para uso humano debido a la presencia de reacciones adversas asociadas a la formación de granulomas en el sitio de inoculación, eritemas y reacciones de hipersensibilidad [Singh and O'Hagan; Offit and Jew, 2003; Pichichero, 2008; Langley et al., 2010; Safari et al., 2011; Dong and Kobinger, 2013]. Además, pueden inducir o exacerbar enfermedades autoinmunes [Petrovsky y Aguilar 2004], o en el caso de las emulsiones ser mutagénicas, carcinogénicas o teratogénicas, posiblemente por su baja biodegradabilidad, por lo que su uso es todavía limitado [Straw et al., 1985].

Tabla 1. Activación de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo por diversos adyuvantes [traducido del texto original de Coffman et al., 2010]			
Adyuvantes registrados	Principal Componente(s) Inmunoestimulador	Receptor innato o mecanismo activado involucrado	Principal respuesta inmune inducida
Adyuvantes aprobados para su uso en humanos			
Sales de aluminio	Hidróxido, fosfato, sulfato	Inflamasoma NLRP3 (?)*	Ac, Th2 (+ Th1 en humanos)
MF59 y AS03	Escualeno en emulsión o/w	Inflamación de tejido (receptor no definido)	Ac, Th1 + Th2
AS04	MPL + hidróxido de aluminio	TLR4 e inflamasoma (?)*	Ac, Th1
MPL y formulaciones (AS01, AS02)	MPL y saponina QS-21	TLR4 (MPL)	Ac, Th1
Adyuvantes en experimentación o en fases clínicas avanzadas			
Poly-IC (ó Poly-ICLC)	Derivados sintéticos de dsRNA	TLR3, MDA5	Ac, Th1, LT CD8+
Flagelina, flagelina fusionada a antígeno	Flagelina de <i>S. Typhimurium</i>	TLR5	Ac, Th1 + Th2
Imiquimod	Derivados de imidazoquinolina	TLR7, TLR8 o ambos	Ac, Th1, LT CD8+ (fusionados)
CpG oligodeoxinucleotido y formulaciones (IC31, QB10)	phophorothioate-sintético unido a oligonucleotidos de DNA (ODNs) con motivos CpG	TLR9	Ac, Th1, CD8+ T (fusionados)
CAF01	trehalosa dimicolato	Lectina tipo C inducida en macrófagos (Mincle)	Ac, Th1, Th17
ISCOMS and ISCOMATRIX	Saponinas	Mecanismo indefinido	Ac, Th1+ Th2, LT CD8+
IFA (y formulaciones de Montanide)	Aceite mineral o parafina + surfactante	Mecanismo indefinido	Ac, Th1 + Th2
CFA	IFA + peptidoglicano, trehalosa dimicolato	NLR, inflamasoma Mincle, TLR(?)	Ac, Th1, Th17

2.1.5 Uso de inmunopotenciadores en la respuesta anti-tumoral

Los inmunopotenciadores se han estudiado también con el propósito de inmunopotenciar la respuesta inmune anti-tumoral. En este sentido se ha abordado con resultados exitosos la inmunoterapia basada en el bloqueo o reprogramación de efectores inmunes tolerogénicos entre los que se encuentran el uso de IFN- α , IL-2, IL-15, IL-21, anti-CD25, anti-PDL1, y anti-CTLA-4, entre otros. Estos tratamientos de muy alto costo (el costo anual mundial en 2016 estimado para tratar melanoma metastásico y NSCLC fue de 3.8 a 84 billones de dólares, respectivamente [Ventola, 2017]) pueden además causar efectos adversos tales como diarrea, fatiga, dermatitis, erupción folicular, así como el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes debido al uso continuo del tratamiento [Maker et al., 2005; Gogas et al., 2006; Fadel et al., 2009; Rech and Vonderheide, 2009; Vonderheide et al., 2010; Roberti et al., 2012]. Los agonistas naturales o sintéticos de los PRRs como los del TLR9 (CpG 7909), TLR7/TLR8 (Imiquimod, resiquimod),

MDA5 (Bo-112), entre otros, han demostrado favorecer la respuesta antitumoral revirtiendo el estado inmunosupresor en el microambiente tumoral [Klinman, 2004; Gnjatic et al., 2010; Shekarian et al., 2017]. El empleo de agonistas de los PRRs produce la activación eficiente del sistema inmune, sin embargo, la inducción de una respuesta fuerte e indefinida puede conducir a un estado de inflamación crónica, al desarrollo de autoinmunidad o efectos secundarios no deseados [Shekarian et al., 2017]

Considerando los avances obtenidos en el conocimiento de los mecanismos de acción de los inmunomoduladores, es claro que la identificación de nuevos inmunoestimuladores con mayor eficiencia y menor toxicidad representa una alternativa de gran interés para el desarrollo de terapias dirigidas para favorecer la respuesta inmune de los individuos con tumores y/o infecciones. El uso de moléculas de menor complejidad como es el caso de péptidos inmunomoduladores podría ofrecer ciertas ventajas asociadas a una producción rápida, mayor estabilidad y mayor seguridad [Rüegg et al., 2006; Dong and Kobinger, 2013].

El área del diseño de moléculas inmunopotenciadoras capaces de ser aplicables al humano es un área de gran interés y responde a la clara necesidad de aumentar la eficiencia de las terapias disponibles actualmente. Por lo cual es indispensable el desarrollo de los estudios clínicos para demostrar la eficacia y la seguridad de un nuevo compuesto respondiendo a los requerimientos de un plan de desarrollo farmacéutico.

2.2 Estudios preclínicos requeridos para los inmunoestimuladores

Un plan de desarrollo farmacéutico requiere la realización de fases preclínicas y clínicas. Las fases preclínicas implican las siguientes etapas:

- Fases de síntesis
- Fases de farmacocinética/farmacodinamia
- Fases de toxicología

Cabe señalar que cada país reglamenta las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en materia de medicamentos y productos biológicos para uso humano. En México, la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) a través de la Comisión de Autorización Sanitaria regula entre otros lo relacionado a registros y licencias sanitarias, ensayos clínicos, moléculas nuevas y vacunas [<https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/comision-de-autorizacion-sanitaria>]. Otros ejemplos de agencias regulatorias

incluye a la FDA (por las siglas en inglés Food and Drug Administration) de Estados Unidos, la EMEA (Agencia Europea del Medicamento) de la Comunidad Europea, la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) de España, la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología) de Argentina Médica <http://www.saludyfarmacos.org/lang/es/boletin-farmacos/otras-paginas-electronicas-de-interes/dir-elec-institucionales/agencias-reguladoras/>].

Por su parte, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) emite guías específicas de cómo llevar a cabo los estudios preclínicos de seguridad enfocadas a la evaluación de sustancias químicas, sin embargo, las recomendaciones son aplicables también a medicamentos [Genoma España 2012]. Por otro lado, la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por las siglas en inglés de International Conference of Harmonisation) es el organismo que se encarga de elaborar guías con los requisitos de calidad, seguridad y eficacia de nuevos fármacos aceptadas en Estados Unidos, Europa y Japón [Genoma España 2012].

Los estudios preclínicos deben considerar la evaluación de moléculas empleando sistemas humanos *ex vivo* tales como sangre completa o células mononucleares (PBMC), así como distintos modelos animales considerando que una molécula podría tener distinto efecto en diferentes hospederos [WHO, 2005; Yeung et al., 2011]. Para considerar un modelo animal adecuado para la evaluación toxicológica preclínica es indispensable que responda inmunológicamente al producto de ensayo [Medina et al., 2003].

2.2.1 Estudios de toxicidad

Los estudios de toxicidad deben abordar los posibles riesgos asociados a la administración de los productos con la intención de ayudar a planificar los protocolos de ensayos clínicos [WHO, 2005]. Cada fármaco requiere su propio desarrollo preclínico en función del tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicación terapéutica [Genoma España 2012]. Hasta el momento no existen guías específicas para la evaluación de moléculas inmunopotenciadoras como los adyuvantes. Sin embargo, los requisitos generales para la inclusión de cualquier componente (conservadores, diluyentes, adyuvantes, ingredientes) a un producto que posee licencia para su uso debe incluir la evidencia de que su presencia en el producto no afecta negativamente la seguridad o potencia de éste [21CFR610.15, 2018]. Por otro lado, debido a que se han reportado efectos tóxicos asociados a los componentes de vacunas como son adyuvantes o conservadores, las guías para la evaluación preclínica de vacunas incluyen consideraciones que hay que tener en cuenta para llevar a cabo los estudios de toxicidad de estos componentes [CPMP, 1997; WHO,

2013]. En el caso de los adyuvantes, cuando no existen datos acerca de su toxicidad, primero se deben realizar estudios de toxicidad del inmunoestimulante sólo, de la misma forma en la que se lleva a cabo para nuevas moléculas [Verdier, 2002; ICH, 2010]. El objetivo de la evaluación toxicológica es identificar un nivel de dosis, como la dosis sin efecto adverso observable (NOAEL, por las siglas en inglés de No observed adverse effect level) o la máxima dosis tolerada (MTD), que pueda guiar en el inicio de la dosificación en los estudios clínicos [FDA, 2011].

Los estudios de toxicidad pueden ser a dosis única o repetida dependiendo del esquema de dosificación propuesto para la administración del producto y deben considerar la vía de administración sugerida [Genoma España 2012]. La toxicidad a dosis única se refiere a la administración de una sola dosis que comprende la dosis a emplear en humanos o el máximo volumen permisible por la vía de administración a ser empleada [Nuñez et al., 2006]. La administración a dosis repetida pretende evaluar efectos acumulativos y órganos diana al maximizar la exposición del compuesto con una aplicación adicional al esquema propuesto para su uso en humanos [Medina et al., 2013; HogenEsch et al., 2017]. La duración del estudio está relacionada con la duración, indicación terapéutica y finalidad del estudio clínico y debe ser igual a la duración del ensayo clínico cuando éstos sean menores a 6 meses y tendrán una duración máxima de 6 o 9 meses cuando la duración del estudio clínico sea superior a los seis meses [ICH, 2010]. Además, deberá incluir preferentemente dos especies, una roedora y otra no roedora [Bustamante, 2001; ICH, 2010]. En ocasiones se puede combinar con la evaluación de inmunogenicidad [CPMP, 1997; Genoma España 2012]. En ambos casos se debe evaluar la influencia del género en el efecto evaluado, por lo que se deben incluir individuos de ambos sexos [OECD 2018].

Por otra parte, las pruebas de toxicidad pueden clasificarse en agudas, subcrónicas o crónicas para determinar los efectos tóxicos del compuesto sobre el individuo después de evaluar distintos parámetros biológicos o fisiológicos tales como peso corporal, consumo de alimento, biomarcadores clínico-patológicos, necropsia e histopatología [Medina et al., 2003; Hu et al., 2014]. La toxicidad aguda generalmente se lleva a cabo a dosis única empleando la vía de administración parenteral y la que se empleará en la clínica, con una duración de 14 días de observación consecutiva en los que se evalúa mortalidad, signos clínicos y comportamiento. La información que proporciona está orientada a determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) o predecir las consecuencias de una sobredosis [ICH 2010; Deshpande et al., 2016; Zhang et al., 2017]. Por otra parte, los estudios de toxicidad subcrónica o crónica están asociados con un esquema de dosificación repetida en la que el estudio está orientado a evaluar los efectos sobre los órganos evaluados a través de pruebas bioquímicas y parámetros histopatológicos con la intención de

obtener la dosis NOAEL [Bustamante, 2001; Ramot et al., 2012; Zhang et al., 2017; OECD 2018]. Además, dentro de estos estudios se puede incluir la evaluación de la tolerancia local para la vía de administración destinada al uso humano, principalmente para los productos administrados por vía parenteral [CPMP, 2001].

2.2.2 Ensayos de genotoxicidad

Los ensayos de genotoxicidad pueden ser definidos como estudios *in vivo* o *in vitro* que permiten detectar compuestos que inducen directa o indirectamente daño genético a través de mecanismos relacionados con las proteínas que intervienen en la reparación del DNA o en el funcionamiento del huso mitótico [Adams et al., 1994]. Generalmente se considera que el daño en el material genético puede potencialmente producir mutaciones que podrían generar un proceso carcinogénico.

Las pruebas más utilizadas para discriminar si una sustancia tiene o no potencial genotóxico son la prueba de aberraciones cromosómicas, la prueba de Ames, el ensayo de linfoma murino y la prueba de micronúcleos [Kirkland et al., 2005]. La combinación de dos o tres de estas pruebas permite generar resultados más confiables acerca del posible potencial mutagénico de una sustancia [Kirkland et al., 2005; Nesslany 2017]. Las pruebas *in vitro* generalmente requieren el uso de una fuente exógena de activación metabólica considerando que muchas sustancias xenobióticas solo presentan efecto mutagénico después de ser metabolizados por la acción de las enzimas. La activación metabólica de compuestos mutágenicos se logra al complementar el sistema de estudio mediante la adición de una preparación de microsomas de mamíferos, generalmente una fracción obtenida del macerado de hígado de rata después de centrifugarlo a 9000 x g (fracción S9), la cual contiene la enzima citocromo P450 entre otras enzimas citosólicas [Hubbard et al., 1985]. Sin embargo, se debe tener cuidado en seleccionar el origen, proporción empleada y la sustancia de estudio a fin de evitar errores en la evaluación de mutagenicidad [OECD 473, 1997; Nesslany 2017].

La prueba Ames o de mutación reversa bacteriana (prueba *in vitro*) se basa en detectar mutaciones que revierten mutaciones presentes en las cepas de prueba, generalmente cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* deficientes en un aminoácido, las cuales reestablecen la capacidad funcional de la bacteria para sintetizar el aminoácido esencial. El tipo de mutaciones puntuales que detecta implican sustitución, adición o eliminación de uno o pocos pares de bases de ADN [OECD 471, 1997]. Las cepas de *S. typhimurium* detectan mutaciones en los pares de bases GC mientras que las de *E. coli* detectan daño en los pares AT [Beedanagari et al., 2014].

La prueba de micronúcleos (MN) *in vivo* se emplea para detectar indirectamente el daño inducido a los cromosomas (daño clastogénico) o al huso mitótico de eritroblastos (efecto aneuploidógeno) por el agente en estudio mediante la evaluación de eritrocitos obtenidos de médula ósea o de sangre periférica de animales, generalmente roedores [OECD 474, 1997]. Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos que contienen fragmentos o cromosomas enteros que no se incorporan correctamente al núcleo de las células hijas durante la transición metafase-anafase en la mitosis [Zalacain et al., 2005; Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013]. La presencia de MN puede ocurrir espontáneamente, sin embargo, se incrementa en presencia de ciertos agentes endógenos o exógenos, convirtiéndose así en un indicador de agentes mutagénicos, genotóxicos o teratógenos [Heddle et al., 1991].

Por su parte, la prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* permite identificar agentes causantes de aberraciones estructurales del cromosoma o cromátida en células de mamíferos cultivadas, los cuales pueden ser cultivos de líneas o cultivos celulares primarios [OECD 473, 1997]. Para este fin, las células en cultivo expuestas al agente en estudio en presencia o no de la fracción S9, son arrestadas en metafase a fin de evaluar microscópicamente la presencia de aberraciones cromosómicas. El tipo de anomalías clastogénicas en los cromosomas incluye inserciones, traslocaciones, inversiones, deleciones y anillos.

Considerando la relevancia que han tomado las moléculas inmunomoduladoras para aumentar la inmunidad frente a distintas circunstancias asociadas a condiciones de inmunosupresión inducidas o fisiológicas, en nuestro grupo de investigación hemos evaluado la capacidad inmunopotenciadora del péptido GK-1 el cual ha demostrado ser eficiente como adyuvante y agente inmunoterapéutico en distintos modelos neoplásicos murinos, con la intención de que pueda ser empleado en humanos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Identificación del péptido GK-1

Nuestro grupo de investigación se ha enfocado a la búsqueda de antígenos protectores para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina, sin embargo, considerando las dificultades económicas y experimentales que presenta la investigación con cerdos se ha empleado un modelo experimental de cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Utilizando este modelo, se identificaron tres fracciones de antígenos protectores de 56, 66 y 74 kDa obtenidos de extracto total de cisticerco de *T. crassiceps* [Valdez et al., 1994]. Con el propósito de disponer de cantidades adecuadas de estas fracciones para su extenso

empleo en vacunación, basados en la mayor protección obtenida independiente de la dosis empleada, se decidió producirlos mediante técnicas de ADN recombinante generando una librería de ADNc del cisticerco de *T. crassiceps*. En esta librería se destaca el antígeno denominado KETc7, el cual resultó protector contra la cisticercosis murina [Manoutcharian et al., 1995, 1996]. Este antígeno corresponde a una secuencia de 97 aminoácidos (aa) que pertenece a la clona recombinante de la fracción de 56 kDa, el cual presenta un alto contenido de prolinas. El análisis de la secuencia permitió realizar una predicción teórica de las regiones de mayor antigenicidad basado en el método de Hoop y Woods (Figura 3) [Hoop and Woods, 1981], identificándose tres secuencias denominadas GK-1, GK-2 y GK-3 [Gevorkian et al., 1996].

3.2 Características del péptido GK-1

El péptido GK-1 corresponde a una secuencia de 18 aminoácidos que abarca los aa 69-85 de la proteína KETc7 obtenida originalmente de la biblioteca de cDNA de *T. crassiceps* [Toledo et al., 1999]. Recientemente, después de la obtención del genoma completo de *Taenia solium* [Tsai et al., 2013], se ha logrado identificar la secuencia completa de la proteína KETc7 que consiste de 264 aminoácidos, la cual presenta dos dominios funcionales conservados. Un dominio HGRAM en el extremo amino terminal y un dominio WWbp2 en el extremo carboxilo terminal, en el cual se localiza la secuencia del péptido GK-1. Las proteínas de unión a los dominios WW (WWbp) son pequeños motivos repetidos que se caracterizan por presentar un alto contenido de residuos PY o PT de la forma PPPPY, aunque aún se desconoce su función biológica [Bobes et al., 2017]. Por otro lado, la secuencia del péptido GK-1 se localiza en distintos estadios del parásito de *T. crassiceps*, así como de otros céstodos, en los que no se encontraron cambios en la secuencia de aminoácidos (Figura 3) [Rassy et al., 2010].

```

1  GCA TTT ATG CAG CCG CAT CCT TCC TTC TCT CCA CCG CCA GTT GAT TAT CTG TAC CAG ACA
1  A F M Q P H P S F S P P P V D Y L Y Q T

61  AAC TCT CCA CCG CCC TAT GGG GGC GCT GTC CCT CCA CCT TAC GCG CCG AAT CCA GGT CCA
21  N S P P P Y G G A V P P P Y A P N P G P

121 CCG CCG CCA TAC ACG GGT GCG GCA AGT TCG ATG CCG CCT TAT CCG ACC GGT GGT CCG CCA
42  P P P Y T G A A S S M P P Y P T G G P P

181 CCC GTC AAC ACC GGT TAT TAC TAT CCA TCT GAT CCA AAT ACC TTC TAC GCT CCA CCC TAC
61  P V N T G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y

241 AGC CAG GCT TCA GCA CCT CCT ATG GAA CCA GAA GAT AAG AAG AAT CTT TAG
81  S Q A S A P P M E P E D K K N L *

```

KETc7



Péptido de 18 aa

GYYYPSDPNTFYAPPYSA

T. crassicepsORF	LYQTNSPPPYGGAVPPPYAPHPGPPPPYTCAA-SSMPPYPTGGPPP	VNTGYIYPSDPNTFYAPPYSA	SASAPPHEPEDKKNL
T. crassicepsNFU	LYQTNSPPPYGAVPPPYTPHPGPPPPYTAASSMPPYPTGGPPP	VNTGIYPSDPNTFYAPPYSA	-----
T. solium	LYQTNSPPPYGAVPPPYTANPGPPPPYTAASSMPPYPTGGPPP	VNTAIYPSDPNTFYAPPYSA	SASAPPHEP-----
T. saginata	-----	VNTAIYPSDPNTFYAPPYSA	SASAP-----
E. granulosus	-----	VNTAIYPSDPNTFYAPPYSA	-----
E. multilocularis	-----	VNTGIYPSDPNTFYAPPYSA	SASAPPHEPEDKKNL
	1.....10.....20.....30.....40.....	50.....60.....70.....80..	

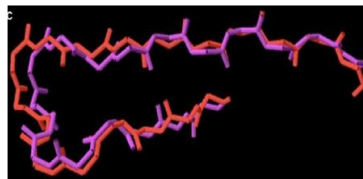


Figura 3. Determinación del epítipo GK-1 en la secuencia del antígeno KETc7 de *Taenia crassiceps*. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de GK-1 en distintas especies de la familia Taeniidae. Modelo de la estructura 3D de GK-1, la estructura en morado corresponde a la secuencia originalmente obtenida en la biblioteca cDNA *T. crassiceps*.

El péptido GK-1, cuya secuencia es GYYYPSPDPNTFYAPPYSA(A), tiene un peso molecular de 2.07 kDa y está constituido mayoritariamente por aminoácidos de naturaleza hidrofóbica (Tirosina, Fenilalanina, Alanina) que le confieren poca solubilidad en agua. Sin embargo, presenta un punto isoeléctrico teórico de 3.1, lo cual le permite tener una carga neta negativa a pH fisiológico debido a la presencia de un residuo de aspartato (D) y esto ha permitido que sea soluble en solución salina isotónica (SSI) en concentraciones máximas de 2mM [Cervantes-Torres et al., 2017].

Por otro lado, la predicción de la estructura tridimensional del péptido muestra que adquiere una conformación estérica hacia el extremo amino terminal que pudiera ser de importancia en el reconocimiento del péptido por las células presentadoras de antígeno (APC) (Figura 3) [Rassy et al., 2010].

3.3 Comportamiento de GK-1 como CPP

Con relación a los péptidos CPP, se ha descrito que el mecanismo de entrada a la célula depende de diversos parámetros como son: tamaño, temperatura, tipo celular, carga, etc. Sin embargo, se ha descrito que los CPP pueden emplear más de una forma para entrar a la célula, ya que la

secuencia peptídica solo determina indirectamente la termodinámica de inserción del péptido en la membrana, es decir, se ha visto que la afinidad de secuencias hidrofílicas puede incrementarse cuando se unen a la membrana en forma helicoidal [Lindgren and Langel, 2011]. Además, la concentración en la que se emplean los CPP puede influir también en el mecanismo de entrada, ya que concentraciones altas por encima de 10 μM pueden llevar a la internalización independiente de energía. Por otro lado, el tipo de molécula asociada a los CPP puede también influir en la forma en que la célula los captura y libera al interior. Se han reportado diversas estrategias que permiten incrementar la hidrofobicidad de los CPP para favorecer su liberación al interior, asociándolos a motivos lipídicos. Hällbrink y colaboradores en el 2001 sugirieron que la estabilidad extra- e intracelular es un parámetro que determina la cantidad de péptido que ingresa a la célula.

En los últimos años se han diseñado estrategias computacionales que permiten llevar a cabo la predicción de moléculas como posibles CPP. Tal es el caso del algoritmo desarrollado por el grupo de Gautam, el cual considera la composición de aminoácidos, el perfil binario de motivos y las propiedades fisicoquímicas de las secuencias peptídicas [Gautam et al., 2013]. Empleando dicho algoritmo se ha calculado al péptido GK-1 como una posible molécula con características de CPP (<http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/submission.php>) (Figura 4).

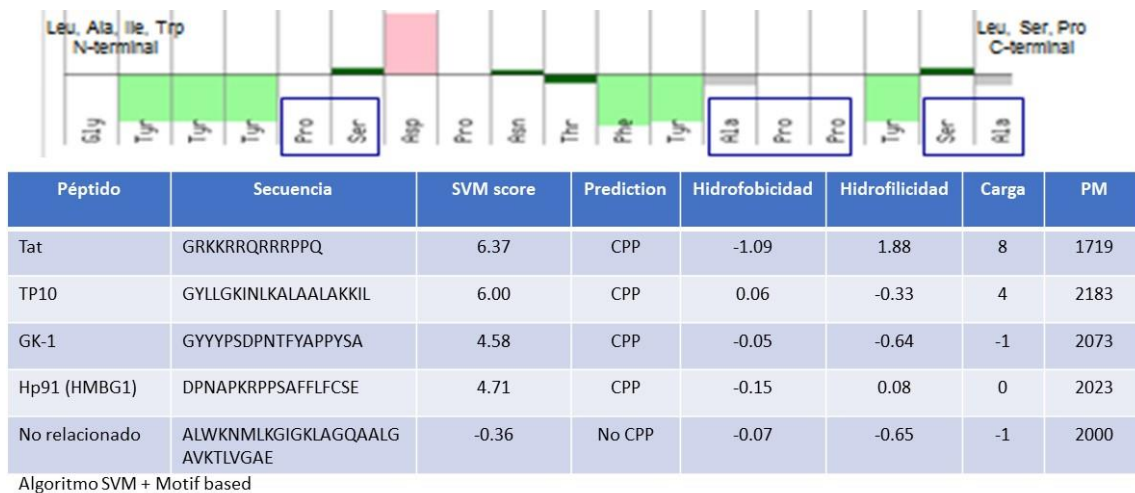


Figura 4. Predicción *in silico* del comportamiento como CPP del péptido GK-1 considerando su composición y presencia de motivos

Se ha señalado que ciertos residuos tales como Arg, Lys, Pro, Trp, Leu y Ala en ciertas posiciones favorecen la entrada a la célula [Gautman et al., 2013]. El encontrar que GK-1 funciona como CPP no descarta la posibilidad de que éste interactúe con las APCs a través del reconocimiento mediado por diferentes receptores de superficie.

3.4 Características inmunogénicas de GK-1

El péptido GK-1 ha sido evaluado extensamente como componente de la vacuna contra la cisticercosis en un modelo de cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* [Toledo et al., 1999]. De esta forma se ha reportado que el péptido, en presencia de saponina como adyuvante, induce altos niveles de protección en contra de la parasitosis acompañado de una baja respuesta humoral específica que reacciona contra el propio péptido y el antígeno total de *T. crassiceps* [Toledo et al., 1999]. Además, se ha reportado que la capacidad protectora de GK-1 está asociada a la inducción de una respuesta inmune celular específica capaz de estimular la proliferación de linfocitos CD8+ y CD4+ estimulados con el péptido GK-1 solo o con el antígeno total de *T. crassiceps* [Toledo et al., 1999]. A este respecto, se ha identificado *in silico* la presencia de dos epítopes T lineales en la secuencia de KETc7 que involucran residuos del péptido GK-1, el primero YYPSDPNTF, que exhibe alto nivel de asociación con el complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC- I) y otro epítope T (TFYAPPYSQASAPPM), el cual se asocia con el MHC-II asociado a los últimos nueve aminoácidos del péptido [Bobes et al., 2017]. Además, se ha encontrado que induce una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de altos niveles de IFN- γ e IL-2, así como bajos niveles de IL-4 [Toledo et al., 1999; Díaz et al., 2003]. Por otro lado, se encontró que el péptido GK-1 en ausencia de adyuvante administrado por vía oral fue capaz de inducir protección en contra de la cisticercosis. Indujo también un incremento en la población de linfocitos en estado de activación en el bazo, placas de Peyer y ganglio mesentérico [Fragoso et al., 2011], demostrando que el GK-1 por sí solo puede estimular la activación y proliferación de poblaciones celulares que son fundamentales en la inducción de una respuesta inmune específica.

Considerando las propiedades pro-inflamatorias de GK-1 expuestas anteriormente, nuestro grupo de investigación evaluó su posible potencial como inmunopotenciador en un modelo experimental de influenza en ratón. Se identificó la capacidad adyuvante del péptido GK-1, cuya co-administración con la vacuna de influenza fue capaz de incrementar la respuesta inmune protectora inducida por vacunación, medida en términos de los niveles de anticuerpos, proliferación celular específica inducida y eficiencia de protección de la vacuna tanto en ratones jóvenes como envejecidos después del desafío [Segura-Velázquez et al., 2006]. Además, se encontró que el péptido GK-1 fue capaz de reducir también los efectos colaterales inflamatorios inducidos por la propia vacuna de influenza [Segura-Velázquez et al., 2006]. La capacidad adyuvante de GK-1 se encontró asociada a un incremento en la respuesta proliferativa *in vivo* de células T CD4⁺ específicas contra la hemaglutinina viral tras favorecer en células dendríticas (CD) la expresión de moléculas como CD80/86, MHC de clase II y la secreción de factores solubles

pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la quimosina CCL2 [Segura-Velázquez et al., 2009].

Adicionalmente, en los pulmones de los ratones envejecidos tratados con GK-1 se encontró de manera circunstancial una disminución en el tamaño y presencia de carcinomas bronqueoalveolares, los cuales se desarrollan de manera espontánea en la cepa de ratones BALB/c empleada. Estos resultados sugirieron que el péptido podría tener propiedades antitumorales.

Para evaluar esta hipótesis, se determinó su capacidad antitumoral en un modelo de melanoma murino inducido con la línea celular B16-F10. Los ratones inoculados peritumoralmente con GK-1 presentaron un incremento en la sobrevida del 42.58%, una disminución de la tasa de crecimiento tumoral y un aumento en la necrosis del tumor primario, con respecto a los controles administrados con solución salina [Pérez-Torres et al., 2013]. Este efecto se incrementó discretamente cuando se co-administró con el anticuerpo anti-PD-L1 (47.82%) [Vera-Aguilera et al., 2017], el cual se administra actualmente en la inmunoterapia incrementando la actividad citotóxica antitumoral de los linfocitos T.

Recientemente, nuestro grupo de investigación evaluó la capacidad antitumoral de GK-1 en un modelo murino de cáncer de mama inducido con la línea 4T1. Al respecto, se demostró que el péptido GK-1, administrado vía endovenosa, aumenta la sobrevida de los ratones, reduce el tamaño del tumor e incrementa las áreas necróticas en el tumor [Torres-García et al., 2017]. Tal como ocurre en el cáncer de mama en humanos, el modelo de cáncer con la línea 4T1 favorece metástasis en pulmones, hígado, hueso y cerebro [Aslakson et al., 1992; Pulaski et al., 2000; Mi et al., 2004]. Los ratones que recibieron tratamiento con GK-1 mostraron una disminución en el número de focos metastásicos en los pulmones. Además, se observó un incremento en los niveles de IL-12 en el tumor primario, que podría estar involucrado con la infiltración de linfocitos CD8+, células NK y NKT, así como una reducción de b-FGF, CCL-2, CCL-3, GM-CSF, TNF- α , y CXCL-9 asociados posiblemente a la reducción en la metástasis al inhibir la proliferación de células esenciales para el desarrollo de tumores secundarios [Torres-García et al., 2017].

En el contexto de cáncer se sabe que el microambiente tumoral favorece un ambiente inmunosupresor asociado con la presencia de células mieloides supresoras (MDSC), macrófagos asociados a tumor (TAM por sus siglas en inglés), células T reguladoras y factores solubles inmunosupresores que conducen, entre otros factores, al agotamiento de los linfocitos T y la disfunción de las APC [Cervantes-Torres et al., 2019].

Al respecto, empleando el modelo de melanoma con la línea B16-F10-OVA hemos reportado que GK-1 promueve una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos a través de

favorecer sus funciones efectoras asociadas a un incremento en la infiltración al tumor de células efectoras (OT-I CD44+CD62L-) productoras de IFN- γ . Además, la respuesta antitumoral se asoció con una disminución en la expresión de PD-1 en las células CD8+ OT-I infiltradas al tumor (TILs, por las siglas en inglés de Tumor Infiltrating Lymphocytes), lo que contribuye a una reducción en el tamaño tumoral [Rodríguez-Rodríguez et al., 2019]. Esta respuesta podría estar contribuyendo a contrarrestar el estado de supresión de los linfocitos T infiltrantes al tumor de una manera alterna a la reportada por las inmunoterapias empleadas actualmente y dirigidas a bloquear la acción de receptores de inhibición.

Estos resultados sugieren que uno de los blancos importantes del péptido GK-1 para iniciar una respuesta inmune puede ser a través de la activación de células presentadoras de antígenos: células dendríticas, macrófagos y linfocitos B.

Recientemente, se ha demostrado que el péptido GK-1 es capaz de activar a macrófagos peritoneales (PM Φ) favoreciendo un fenotipo M1 en las primeras horas después del estímulo caracterizado por un aumento en la expresión de CD86 y MHC-II, la producción de óxido nítrico y en la capacidad fagocítica [Sánchez-Hernández et al., 2018].

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de microarreglos para evaluar la expresión de genes que modula el péptido en estas células. El análisis transcriptómico de los PM Φ tratados con GK-1 mostró un incremento en la síntesis del RNA mensajero de genes de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12, CXCL10, CCL3, CCL2), así como de los genes involucrados en las vías de señalización de las MAPK y los TLRs [Sánchez-Hernández et al., 2018].

Estos resultados señalan la importancia de estudiar el mecanismo a través del cual GK-1 podría interactuar con las APC para modular sus funciones, así como su inocuidad para proponer su uso en humanos.

4. HIPÓTESIS GENERAL

El péptido GK-1 es un inmunomodulador inocuo adecuado para uso humano capaz de activar células presentadoras de antígeno a través de receptores de tipo TLR que conlleva a la activación del factor de transcripción NF- κ B y a la producción de citocinas proinflamatorias.

5. OBJETIVO GLOBAL

Realizar los estudios preclínicos del péptido GK-1 que abarcan la farmacodinamia, identificando el mecanismo molecular a través del cual el péptido activa células dendríticas, y los estudios de toxicidad del péptido GK-1 para evaluar los posibles efectos adversos asociados a su administración.

Para fines del estudio la estrategia experimental y los resultados se dividirán en dos apartados, el primero para ahondar en el estudio de los mecanismos de acción del péptido y el segundo para la evaluación de la seguridad del mismo.

6. Identificación de los mecanismos de señalización asociados a la activación de células dendríticas inducida por el péptido GK-1

6.1 Hipótesis

El péptido GK-1 es capaz de activar a las células dendríticas involucrando vías de señalización y receptores implicados en el desarrollo de un perfil inmunopotenciador.

6.2 Objetivo general

Evaluar el mecanismo molecular a través del cual el péptido GK-1 activa a las células dendríticas ejerciendo un efecto inmunopotenciador.

6.3 Objetivos particulares

- 1) Determinar el estado de activación de las células dendríticas
- 2) Determinar si las vías de señalización MAPK y NF- κ B están implicadas en la activación de las células dendríticas inducida por el péptido GK-1
- 3) Evaluar si el péptido GK-1 es ligando de alguno de los receptores PRR's
- 4) Evaluar si el péptido GK-1 es capaz de internalizar en las células dendríticas

6.4 Materiales y métodos

6.4.1. Generación de células dendríticas a partir de médula ósea (BM-DC)

Se prepararon suspensiones celulares a partir de la médula ósea obtenida de la tibia y el fémur de ratones C57BL/6J, BALB/cAnN o ratones deficientes en el factor de diferenciación mieloide 88 (Myd88) (JAX stock #009088; The Jackson Laboratory), las cuales fueron tratadas con una solución de NH₄Cl [155mM], KHCO₃ [9 mM] y EDTA [0.12 mM] para eliminar eritrocitos. Las

células fueron resuspendidas a una concentración de 10^6 células/mL en medio RPMI 1649 (GIBCO) suplementado con 5% SFB (GIBCO), $50\mu\text{M}$ β -mercaptoetanol, $20\mu\text{g/mL}$ gentamicina, 10mM HEPES (Promega) y 20ng/mL del factor estimulador de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF recombinante; Peprotech), para el desarrollo de DC a partir de progenitores hematopoyéticos con fenotipo CD11c⁺ MHC-II⁺ [Liu and Nussenzweig, 2010]. El medio fue reemplazado por medio complementado con el factor GM-CSF a los 3 días de cultivo y las células se cosecharon al día 6 de diferenciación.

6.4.2. Estimulación *in vitro* de las BM-DC con GK-1 para la evaluación de los mecanismos de activación y señalización

Al día 7, las BM-DCs (pureza >70% evaluada mediante la expresión de CD11c⁺/IaIe⁺ por citometría de flujo) fueron estimuladas con GK-1 en las concentraciones de 10 ó $100\mu\text{g/mL}$, LPS [100ng/mL] (Sigma-Aldrich) o sólo medio de cultivo durante 10 y 24 horas. Adicionalmente, se llevó a cabo un pulso de LPS [100ng/mL] durante 4 horas previas al estímulo del péptido GK-1 a ambas dosis por un periodo de 10 y 24 horas.

Para el análisis de la activación de las MAPK, las BM-DC se estimularon con el péptido GK-1 [10 ó $100\mu\text{g/mL}$] o LPS durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos y los extractos totales se obtuvieron en cada tiempo. Para evaluar la activación de NF- κ B, las BM-DC de ratones C57BL/6J o deficientes en Myd88 se trataron con GK-1 en ambas dosis o LPS durante 0.5, 1, 2 ó 3 horas y se obtuvieron los extractos nucleares en cada tiempo.

6.4.3. Determinación de la activación de las BM-DC

Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, las células se desprendieron con tripsina 0.05%-EDTA 25 mM durante 5 minutos y 5×10^5 células por condición se tñeron para el análisis mediante citometría de flujo. Las células fueron tratadas con el anticuerpo anti-CD16/32 (clona 93, Biolegend) para bloquear los receptores Fc durante al menos 20 minutos a 4°C en una solución de PBS con 5% SFB y 0.02% azida de sodio (solución de tinción). Posteriormente, se realizó la tinción de marcadores de superficie durante 25 minutos empleando los siguientes anticuerpos (Biolegend): anti-CD86-Phycoerythrin (PE) (clona GL-1), anti-CD80-PECy5 (clona 16-10A1), anti-Ia/Ie-biotin (clona 2G9), anti-CD11c-FITC clona N418). En todos los experimentos se incluyeron los controles de isotipo correspondientes. Las células se lavaron y resuspendieron en PBS con 1% formaldehído. Las muestras fueron adquiridas en el Attune Nxt cytometer (Thermo Fisher) y analizadas con el Software FlowJo (v.8.7).

6.4.4. Evaluación de la activación de las vías de las MAPK por GK-1 mediante Western blot

La activación de las MAPK en las BM-DC se evaluó mediante la fosforilación de las cinasas para lo cual las placas conteniendo las células dendríticas previamente estimuladas se colocaron sobre hielo, se lavaron con PBS e inmediatamente después se lisaron con buffer de lisis RIPA frío (20 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4; 0.5% Triton X-100X, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sodio), adicionado con un cocktail de inhibidores de fosfatasa y proteasas (25 mM fluoruro de sodio (NaF), 1 mM pirofosfato de sodio (NaPPi), 1 mM vanadato de sodio (NaVPO₄), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0.1 mg/ml pepstatina A, 0.1 mg/ml leupeptina, 0.1 mg/ml antipaina, 0.1 mg/ml aprotinina) (Todos de Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Posteriormente, las células se levantaron mediante el uso de gendarme y se centrifugaron a 15600 x g durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas en el sobrenadante se cuantificaron mediante el método de Lowry. Para llevar a cabo el Western blot, se prepararon las muestras a partir de 10 µg de proteína, las cuales se sometieron a calentamiento durante 5 minutos a 100°C en buffer de muestra (1.5 M Tris-HCl, SDS 12%, Glicerol 40%, azul bromofenol 0.06%) conteniendo β-mercaptoetanol y posteriormente, se cargaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 10%. La transferencia se llevó a cabo en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en buffer de transferencia (25 mM Tris, pH 8.5; 193 mM glicina; 20% metanol).

Una vez concluida la transferencia, las membranas se lavaron con agua y posteriormente se tiñeron con rojo de Ponceau para comprobar la transferencia adecuada de las proteínas. Una vez verificada la presencia de éstas, las membranas se bloquearon durante 1 hora con buffer de bloqueo TBS-T (50mM Tris buffer pH=7.5 con 0.05% Tween 20) con 2% BSA o 5% leche descremada. Inmediatamente después, se colocaron los anticuerpos primarios anti-p-ERK1/2 (Biolegend), anti-p-p38 (Santa cruz) o anti-β-actina (Abcam) en agitación toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente: anti-IgG ratón (1:5000), anti-IgG conejo (1:10000) y anti-IgG cabra (1:10000), respectivamente). La unión de anticuerpo fue detectada mediante la solución SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). En todos los casos, las bandas visualizadas se escanearon, se analizaron con el software ImageJ y los valores se normalizaron con respecto a la señal de la banda de actina (control de carga empleado).

6.4.5. Evaluación del posible receptor de GK-1: Participación de Myd88 en la señalización mediada por TLR.

Para evaluar la interacción de GK-1 con algún TLR que involucre la participación de Myd88, se diferenciaron células dendríticas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6J (wild type) y deficientes para Myd88 (KO Myd88) y se evaluó la activación del factor NF- κ B mediante la traslocación al núcleo de la subunidad p65 (RelA). Las placas con las BM-DC estimuladas previamente con LPS, GK-1 (10 o 100 μ g/mL) o medio, se lavaron con PBS e inmediatamente después se incubaron en hielo con PBS-EDTA 0.5 mM durante 20 minutos. Las células se levantaron empleando un gendarme y se centrifugaron a 134 x g durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en buffer de lisis (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT) conteniendo el cocktail de inhibidores mencionado previamente y se incubó durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, se adicionó Nonidet P40 al 10%; las muestras se agitaron durante 10 segundos para su posterior centrifugación a 15600 x g por 1 minuto. Los pellets nucleares se resuspendieron en buffer de lisis de núcleos (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) usando inhibidores de proteasas y fosfatasa y se agitaron continuamente durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes nucleares se obtuvieron mediante centrifugación a 15600 x g durante 5 minutos y la concentración de proteínas se cuantificó por el método de Lowry. La electroforesis se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento del apartado 6.4.4. Las membranas se bloquearon durante 1 hora con TBS-T con 2% leche y posteriormente se incubaron durante toda la noche en agitación a 4°C con el anticuerpo anti-NF- κ B p65 (1:10000; Abcam) o con el anticuerpo anti-laminina B1 acoplado a HRP (1:5000; Abcam). Al día siguiente se empleó como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Abcam) y la señal se detectó con el sustrato de gran duración (SuperSignal, Thermo Scientific). Las bandas visualizadas se escanearon y se analizaron con el software ImageJ y los valores se normalizaron respecto a la señal de la banda de laminina (control de carga utilizado).

6.4.6. Determinación *in vivo* de los niveles de citocinas

Ratones C57BL/6J o deficientes en Myd88 se inocularon vía intravenosa con 0, 10 y 100 μ g de GK-1 disuelto en SSI (solución salina isotónica) en la vena caudal. Se obtuvieron muestras de sangre por punción plexo ocular empleando capilares con heparina a las 6, 10 y 24 horas después de la administración. Los sueros se separaron mediante centrifugación a 3500 x g durante 10 minutos y se mantuvieron a -70°C hasta su uso. Se determinaron los niveles de citocinas (IL-6, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-15, TNF- α) y quimiocinas (CCL2, CCL4, CXCL10) mediante el sistema MagPix Luminex (Xponent Software).

Adicionalmente, se obtuvieron los bazos de los ratones a las 24 horas posteriores a la administración del péptido y se homogenizaron empleando un politrón durante 15 segundos en solución de lisis RIPA conteniendo 1 mM PMSF en proporción 1:5 (w/v). Los homogenizados se centrifugaron a 15600 x g durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes para medir los niveles de las citocinas IL-6, IL-12 (p40 y p70) y TNF- α por kits de ELISA (Biolegend).

6.4.7. Evaluación de la capacidad de GK-1 para internalizarse en las células dendríticas

El método más común para evaluar la incorporación de péptidos CPP es acoplándolos a un fluoróforo y midiendo la intensidad de fluorescencia de las células tratadas [Richard et al., 2003; Madani et al., 2011]. Considerando esta información, se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía confocal la incorporación de GK-1 acoplado a HyLite-Fluor 488 (HF488), que es un fluoróforo más estable con respecto a fluoresceína 5-isotiocianato (FITC).

Para evaluar si el péptido GK-1 es capaz de internalizarse en las BM-DC de ratones BALB/cAnN, éstas se estimularon con distintas concentraciones (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 50 y 100 μ M) del péptido acoplado a HF488. Posteriormente las células se incubaron a 4°C o 37°C durante 2 horas para determinar si la entrada a la célula es dependiente o no de energía. Para determinar si la entrada del péptido es saturable, las BM-DCs se incubaron con el péptido a una concentración de 10 μ M a 37°C durante periodos de 0 a 5 horas. Adicionalmente, se evaluó el posible mecanismo de endocitosis asociado a la entrada del péptido empleando inhibidores específicos (depleción de potasio y solución hipotónica de sacarosa 0.5mM (vía clatrin), Nistatina (vía caveolinas), Citocalasina D (polimerización de actina), azida de Sodio (depleción de ATP), EDTA (depleción de calcio), los cuales se incubaron durante 30 minutos previo a la exposición al péptido. Posteriormente se adicionó GK-1 HF488 a una concentración de 10 μ M e incubó durante 1 hora a 37°C.

En todos los casos se realizó un tratamiento con tripsina [1mg/mL] después de la incubación con el péptido para eliminar la posible asociación de éste a la membrana celular. La incorporación de GK-1 a las células dendríticas marcadas con el anticuerpo anti-CD11c PE-Cy5.5 se determinó mediante citometría de flujo en un equipo Attune Nxt Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

Para localizar al péptido dentro de las células, éstas se diferenciaron directamente sobre un sistema de cámara de cultivo sobre portaobjetos tratados (Lab-Tek™ II Chamber Slide™, NUNC, ThermoScientific) y se incubaron en presencia del péptido GK-1 HF488 a una concentración de 10 μ M durante distintos tiempos de incubación a 37°C y en algunos casos, previa incubación con los inhibidores de endocitosis. Las células dendríticas se identificaron mediante la tinción con el anticuerpo anti-CD11c biotinilado y su posterior incubación con estreptoavidina-Texas Red. Se empleó DAPI para teñir los núcleos y ubicar la posición del péptido con respecto a la membrana

y éstos. Las laminillas se visualizaron mediante un microscopio confocal Zeiss LMS 5 Pascal haciendo cortes de profundidad de 500 nm en el plano Z.

6.4.8. Análisis estadístico

Todos los datos recabados en este estudio se analizaron mediante ANOVA y posteriormente se utilizó la prueba t-student, se consideraron diferencias significativas con una $p < 0.05$.

6.5 Resultados

6.5.1. Estudio del mecanismo de activación de las células dendríticas derivadas de médula ósea mediado por el péptido GK-1

Para evaluar el efecto del péptido GK-1 en la activación de las células dendríticas se llevaron a cabo tres análisis bajo dos condiciones de estímulo: 1) El efecto sobre el nivel de expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) en células CD11c+ y 2) el porcentaje de células CD11c+MHCII+ que expresaron CD86, CD80 o CD40 y su nivel de expresión (MFI) cuando se estimularon durante 10 ó 24 horas con el péptido GK-1 solo o con un pulso previo de 4 horas con LPS. La Figura 5 muestra que GK-1 en la dosis de 100 µg/mL induce un incremento significativo en la expresión de MHC-II (Figura 5A) a las 10 horas de estímulo y en la expresión de CD86 (Figura 5B y 5C) a las 24 horas. Este aumento en el nivel de expresión de ambas moléculas fue más significativo ambas dosis del péptido empleado (10 y 100 µg/mL) cuando se dio un pulso de LPS previo al estímulo con GK-1 (Figura 5 A-C). No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de CD80 y CD40 en ningún tiempo evaluado (datos no mostrados).

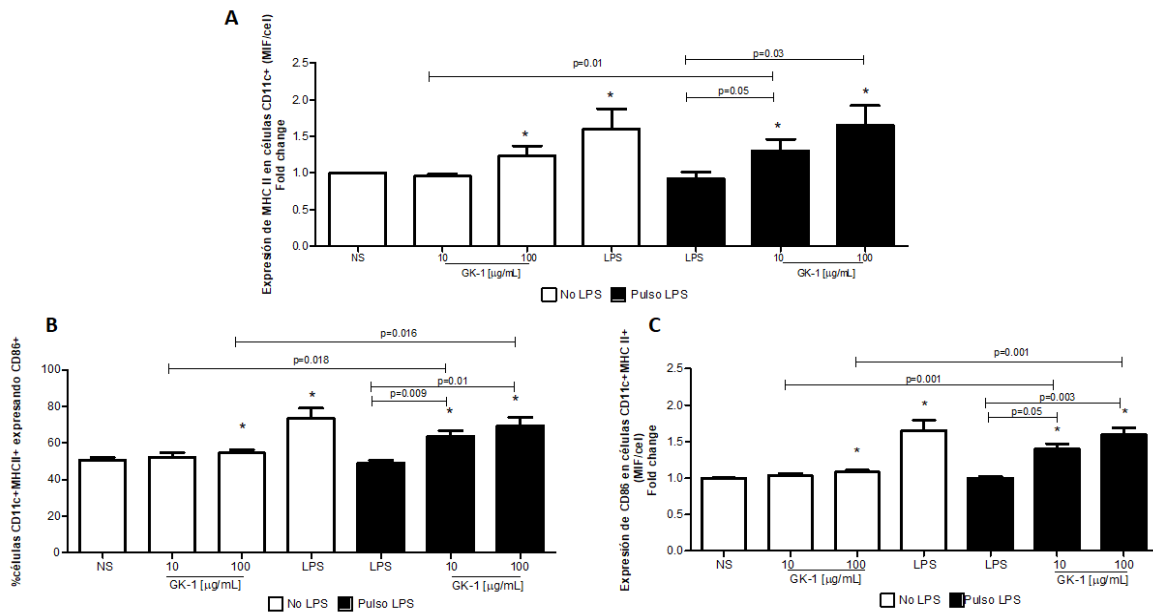


Figura 5. El péptido GK-1 induce la activación de las BM-DCs. Las BM-DCs se incubaron con medio de cultivo solo (NS), péptido GK-1 (10 ó 100 µg/mL), LPS (100 ng/mL) o LPS por 4 h previo al estímulo con GK-1 en ambas dosis durante 10 ó 24 horas. A) La expresión de MHC class II en la superficie de las células CD11c⁺ se detectó mediante el citómetro Attune Nxt y se reporta la intensidad media de fluorescencia por célula (MIF/cel). El porcentaje de CD86 en las células CD11c⁺MHC^{hi} (B) o la intensidad media de fluorescencia (C) de CD86 en las células CD11c⁺MHC^h (MIF/cel) se muestra como la media (± SEM) después del análisis usando el Software FlowJo. Los datos son representativos de 4 a 5 experimentos independientes. *p < 0.05 versus NS o valor de p entre los grupos indicados.

Para profundizar en el mecanismo de acción que conduce a la activación de las células dendríticas, se evaluó el papel que juegan las vías de señalización de las MAPK y NF-κB, considerando su papel en la cascada de señalización mediada por los TLRs.

6.5.2 Activación de MAPK y NF-κB inducido por el péptido GK-1

Respecto del análisis de la activación de las MAPK encontramos que el estímulo de las BM-DC con el péptido en ambas dosis incrementa notablemente la fosforilación de la MAPK p38 con respecto a las células no estimuladas (NS) (Figura 6A). Una clara disminución en esta activación se observa a los 20 minutos de estímulo con la dosis alta del péptido, la cual se reestablece posteriormente (25 y 30 minutos). Como se muestra en la Figura 6B, el estímulo con GK-1 conduce a la activación de la cinasa ERK1/2 desde tiempos tempranos (5 minutos) en la dosis más alta evaluada (100 µg/mL).

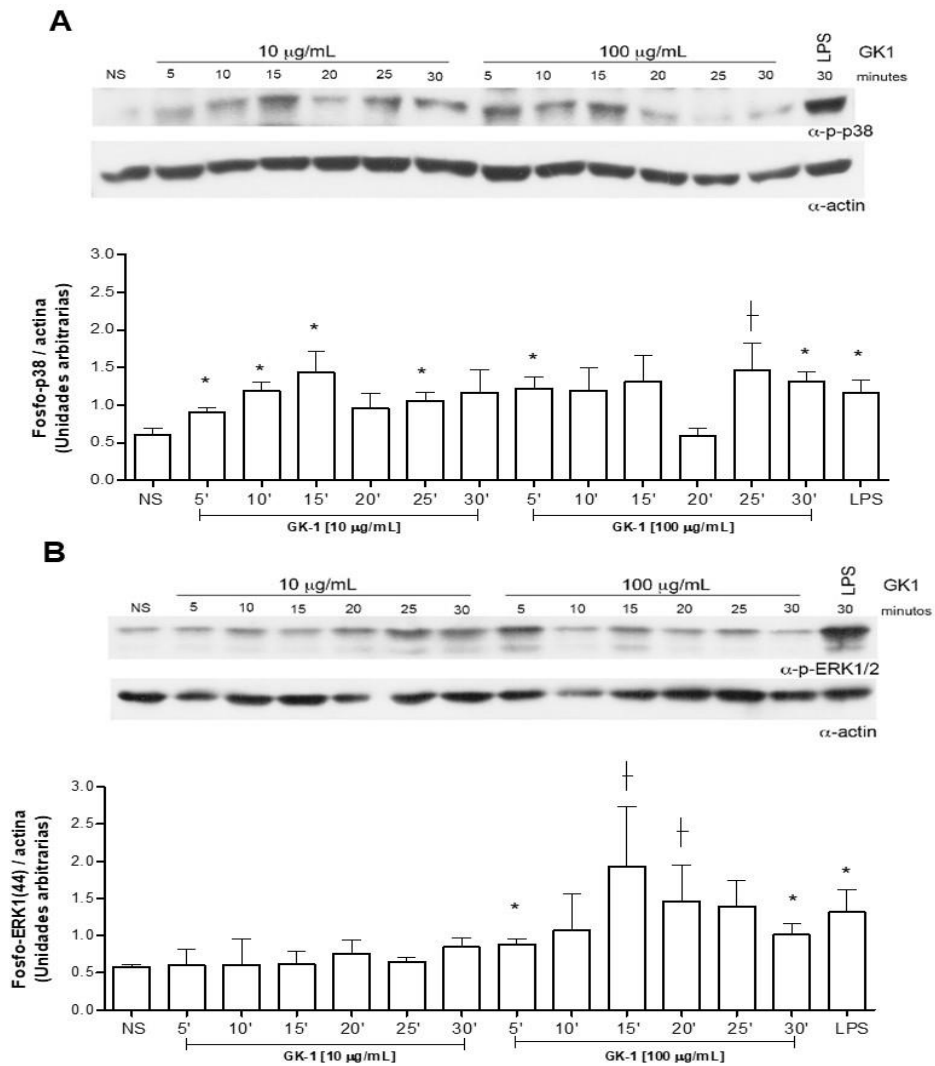


Figura 6. GK-1 induce la fosforilación de las MAPKs p38 y ERK1/2 en las BM-DC. Las BM-DC se incubaron con medio de cultivo solo (NS), GK-1 a 10 ó 100 µg/mL o LPS (100 ng/mL) durante los tiempos indicados. Las células se lisaron y posteriormente los extractos proteínicos totales se corrieron en geles de acrilamida SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF. Se evaluó la activación de las cinasas empleando anticuerpos anti-fosfo p38 y ERK1/2. Análisis de la densitometría después de la reacción de p-p38 (A) y p-ERK1/2 (B) y normalizado con respecto a la intensidad de la banda de actina expresado como unidades arbitrarias. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con NS; † tendencia con respecto a NS.

Con respecto a la activación del factor de transcripción NF- κ B en las BM-DC estimuladas con el péptido GK-1, la figura 7 muestra que el péptido GK-1 en ambas dosis empleadas favorece la traslocación de la subunidad p65 en ratones C57BL/6J desde los 30 minutos de estimulación, la cual se mantiene hasta las tres horas de estímulo. De forma importante, las células obtenidas a partir de médula ósea de ratones deficientes en Myd88 estimuladas con el péptido GK-1 o LPS como control, mostraron una disminución notoria de la internalización de p65 en el núcleo, de forma más significativa en la dosis de 10 µg del péptido (Figura 7).

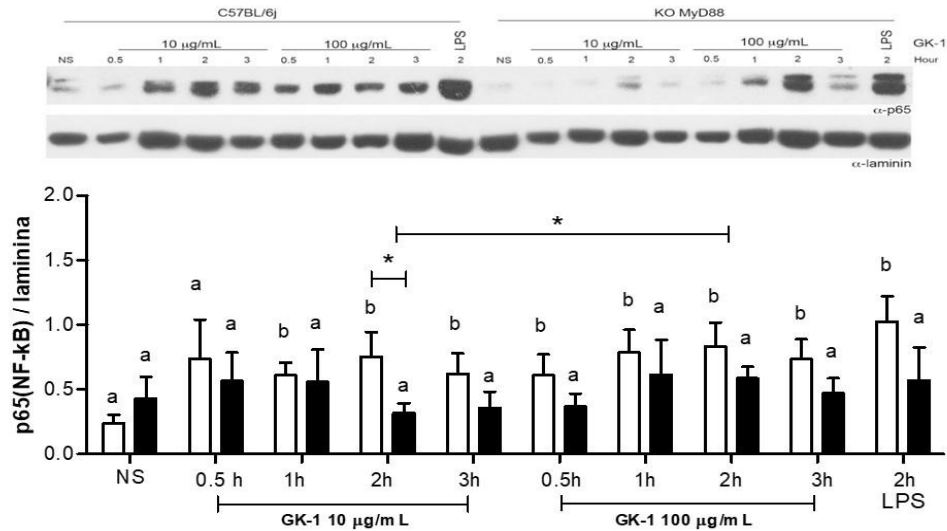


Figura 7. GK-1 favorece la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B p65. Las BM-DC obtenidas *in vitro* de ratones silvestres (WT, \square) o deficientes en Myd88 (\blacksquare) fueron expuestas durante el tiempo indicado con 10 ó 100 μ g/ml de GK-1 y los extractos nucleares se obtuvieron en cada tiempo. Las membranas se trataron con anti-NF- κ B (p65) y anti-laminina. La relación entre la intensidad de la banda de p65 y laminina se calculó y los valores se expresaron en unidades arbitrarias. Los datos se muestran como la media \pm DS. Diferentes literales indican la diferencia significativa respecto a las células incubadas con solo medio (NS), * p <0.05 entre grupos.

Considerando que en los sobrenadantes de cultivo de las BM-DC estimuladas *in vitro* con el péptido en ambas dosis no se observó la producción de citocinas proinflamatorias (datos no mostrados), se llevó a cabo el estudio de la producción de mediadores inflamatorios inducidos por GK-1 en un sistema *in vivo* en ratones C57BL/6J. Para esto, se analizaron los niveles de citocinas y quimiocinas en sueros obtenidos a distintos tiempos posteriores a la administración intravenosa del péptido en ambas dosis evaluadas en los estudios *in vitro* (10 y 100 μ g/mL). La Figura 8 muestra que del conjunto de mediadores evaluados correspondientes a aquellos producidos por los macrófagos y las células dendríticas, hubo un aumento significativo en los niveles de IL-6 a las 10 y 24 horas y de CCL2 a las 10 horas en ambas dosis empleadas (10 y 100 μ g/ratón). La dosis más alta administrada incrementó también los niveles de CCL2 a las 6 horas, así como los niveles de IL-12 e IL-15 a las 24 horas post-administración.

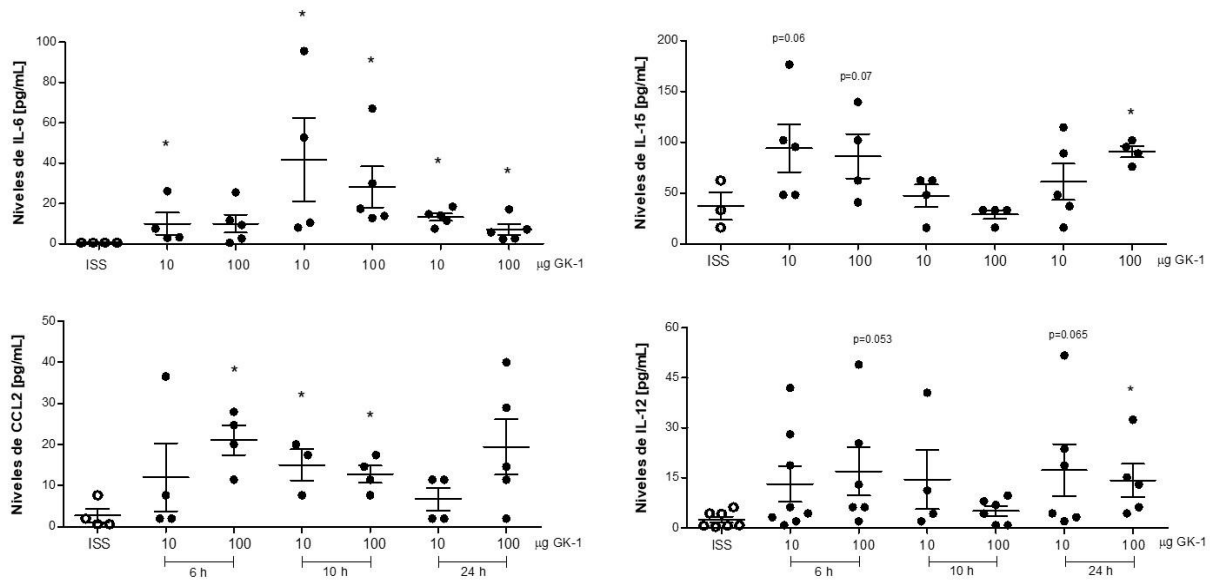


Figura 8. GK-1 induce la producción *in vivo* de IL-6, IL-12, IL-15 y CCL2. Ratones C57BL/6J fueron administrados vía intravenosa en la vena caudal con el péptido GK-1 (● 10 o 100 µg) o ISS (○) como vehículo. La sangre se obtuvo a las 6, 10 y 24 h después de la administración y el suero obtenido se analizó mediante el sistema MagPix Luminex. Los datos se muestran como la media y el SEM de 6 ratones individuales por grupo. * $p < 0.05$ con respecto a SSI.

Por otro lado, para evaluar si los mediadores inflamatorios inducidos por GK-1 eran dependientes de la señalización mediada por el adaptador Myd88, se determinaron por ELISA los niveles de IL-6 e IL-12 (p40 o p70) en los extractos proteínicos obtenidos del bazo de ratones WT C57BL/6J y KO Myd88 administrados con el péptido. Se encontró una disminución en los niveles de IL-6 en los ratones KO Myd88 comparados con los ratones WT en ambas dosis del péptido empleadas (Figura 9). No se detectaron niveles de IL-12 en el bazo de ratones de ambas cepas empleadas.

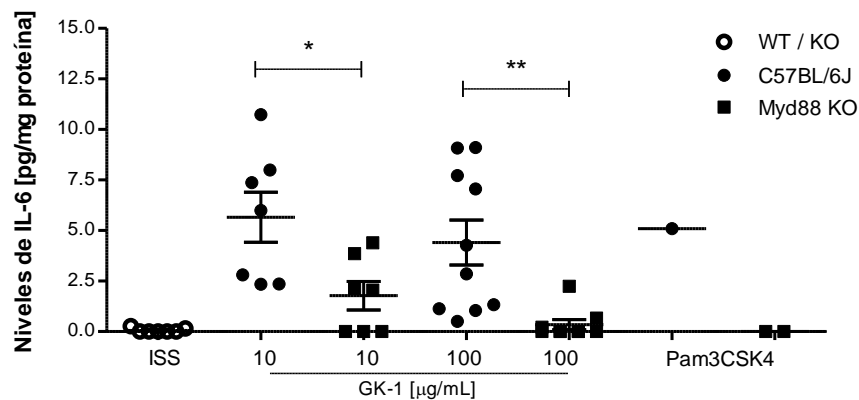


Figura 9. GK-1 induce la producción de IL-6 *in vivo* dependiente de Myd88. Ratones C57BL/6J (●) o deficientes en Myd88 (■) se inocularon vía intravenosa con GK-1 (10 ó 100 µg), ISS (○) como vehículo o Pam3CSK4 (10 µg) como control de agonista de TLR. Se obtuvieron los extractos proteicos de los bazos 24 h después de la inmunización y se analizaron para su análisis por ELISA. Los datos representan los ratones individuales por grupo (Media y SEM se graficaron). * $p < 0.05$ comparado entre grupos.

Adicionalmente como se muestra en la Tabla 2, se evaluó en el suero de los ratones KO Myd88 los niveles de citocinas y quimiocinas inducidas a distintos tiempos después de la administración del péptido, encontrando que GK-1 induce un aumento de IL-6 desde las 10 horas en ambas dosis administradas mientras que induce un incremento de IL-12 e IL-15 cuando se administran 100 µg del péptido. Por otro lado, CCL2 no se induce en los ratones deficientes en Myd88, pero si muestra una disminución significativa respecto a los ratones WT en la dosis de 100 µg del péptido a las 6 y 10 horas post-administración.

Tabla 2. Niveles de citocinas inducidas en suero de ratones deficientes en Myd88 administrados con el péptido GK-1

Citocina	Tratamiento con:		GK-1					
	SSI	6 horas		10 horas		24 horas		
		10 µg	100 µg	10 µg	100 µg	10 µg	100 µg	
IL-6	0.64 (0.01) [†]	1.22 (1.0)	1.29 (1.1)	10.19 (15.1)	12.33 (13.3)	11.63 (14.69)	7.57 (4.98)	
IL-12	2.43 (2.4)	7.03 (6.7)	5.34 (2.9)	5.65 (7.1)	5.59 (5.1)	9.97 (6.4)	20.9 (16.3)	
IL-15	37.4 (23.4)	52.8 (16)	29.1 (8.6)	57.2 (10.4)	52.8 (26.8)	52.5 (29.3)	132.3 (64)	
CCL2	2.74 (3.3)	9.06 (12)	4.56 (7.2)	13.43 (9.2)	4.76 (4.62)	10.56 (9.1)	13.62 (9.9)	

[†] Media (desviación estándar) en pg/mL. Números en negritas indican diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a grupo administrado con SSI

6.5.3 Evaluación de la capacidad del péptido GK-1 de internalizarse en BMDCs

Para determinar la posible incorporación del péptido GK-1 en células dendríticas se realizó un ensayo mediante citometría de flujo. En primer lugar, las BMDC se estimularon durante 2 horas con GK-1 acoplado a HF488 empleando diferentes condiciones: 1) distintas concentraciones (0-100 µM); 2) distintas temperaturas de incubación (4°C o 37°C); 3) tratamiento o no con tripsina. La Figura 10 muestra que el péptido GK-1 si se incorpora en las BMDC de acuerdo con la intensidad media de fluorescencia observada en las células CD11c+. Se puede observar que la incorporación del péptido es dependiente de la concentración, siendo muy significativa ($p < 0.01$) en concentraciones del péptido marcado mayores a 50µM (Figura 10A). Además, en la Figura 10B se observa que la entrada del péptido aumenta significativamente cuando se emplea una temperatura de 37°C respecto a la incubación a 4°C, aunque también se incorpora en menor cantidad a 4°C (Figura 10A). Por otro lado, se observó una ligera aunque no significativa disminución en la intensidad media de fluorescencia de las células tratadas con tripsina (Figura 10B).

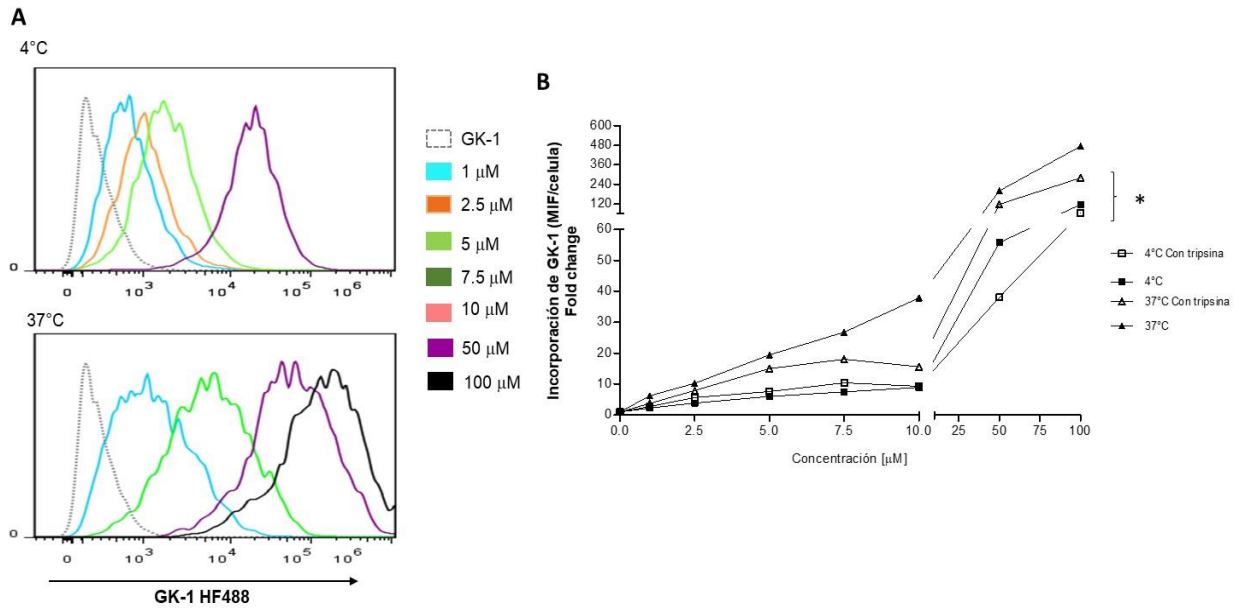


Figura 10. Internalización del péptido GK-1 en las BM-DC dependiente de la concentración y energía. Las BM-DCs se incubaron con el péptido GK-1 (0 a 100 μ M) acoplado a HF488 durante dos horas a 4 ó 37°C, con o sin tratamiento con tripsina. La figura muestra A) los histogramas representativos de la entrada del péptido en células CD11c+ después del tratamiento con tripsina; y B) la media de la intensidad media de fluorescencia del péptido incorporado en las células CD11c+ después de ser tratadas o no con tripsina (MIF/célula) (N=4). * Diferencia significativa entre los grupos $p < 0.05$

Considerando que la entrada dependiente de energía del péptido GK-1 a la célula pudiera estar dada por un receptor, evaluamos si ésta se saturaba en algún momento durante el estímulo con GK-1 HF488. En la Figura 11 se observa que la entrada de GK-1 en las BMDCs es significativa 15 minutos después del estímulo (Figura 11 A) y que se satura a partir de los 45 minutos (Figura 11A). Mediante microscopia confocal se corroboró que el péptido GK-1 se encontraba en el interior de la célula a distintos tiempos de evaluación. La Figura 11B muestra un campo representativo de la laminilla donde se aprecia la presencia del marcador CD11c+ en la superficie de las células, la presencia de DAPI (marcador de núcleos) al interior de las células y de GK-1 distribuido preferencial y homogéneamente dentro de las células, pero la señal es más intensa a las 2 horas del estímulo con el péptido marcado con respecto a los tiempos más tempranos de estímulo (5 y 15 minutos).

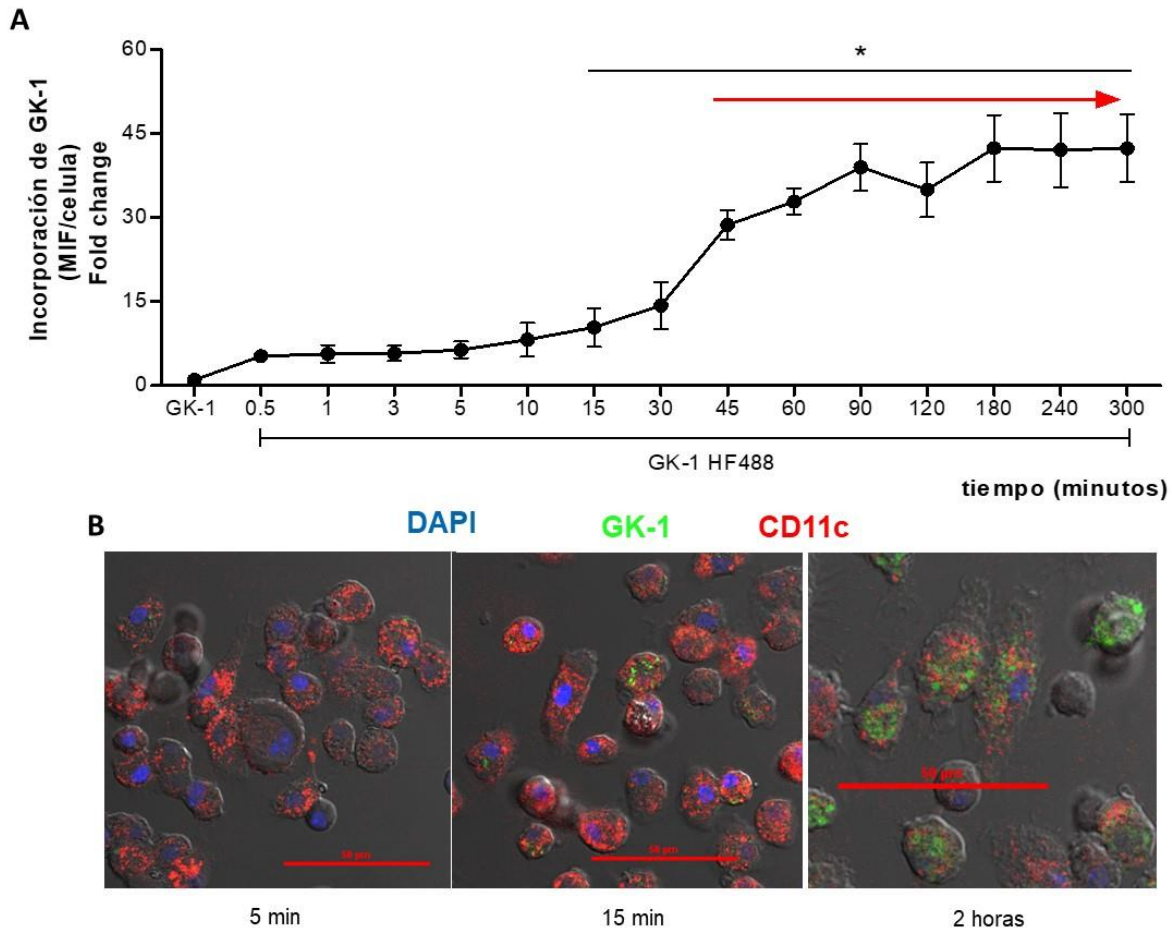


Figura 11. Internalización del GK-1 en las células dendríticas mediado por receptor. Las BMDCs se incubaron con el péptido GK-1 HF488 [10 μ M] durante 30 a 300 minutos a 37°C, con tratamiento posterior con tripsina. A) Media (\pm SEM) de la intensidad media de fluorescencia del péptido marcado (MIF/célula) (N=4) detectada por citometría de flujo. B) Imagen representativa a 40X de células capturadas en el microscopio confocal Zeiss LSM. * Diferencia significativa con respecto al péptido no marcado $p < 0.05$

Una vez que se demostró que la entrada del péptido parece ser mediada por endocitosis y posiblemente a través de algún receptor, se evaluó el posible mecanismo de endocitosis asociado mediante el uso de inhibidores. Se emplearon distintas concentraciones de los diferentes inhibidores con base a las concentraciones reportadas en la literatura que eran capaces de inhibir la endocitosis. La Figura 12A muestra que el azida de sodio [10mM], la citocalasina D [10-60 μ M] y el EDTA [2.5-20 mM]. Todos estos inhibidores generales de la endocitosis disminuyeron la entrada del péptido a las BMDCs. Por otro lado, la eliminación de potasio en conjunto con el cambio hipotónico (PBS-sacarosa 0.45M), empleados para evaluar el mecanismo mediado por clatras, disminuyó de forma significativa la entrada del péptido GK-1 mientras que la nistatina, inhibidor de endocitosis por caveolinas, no afectó la entrada del péptido a la célula en ninguna concentración empleada [25-100 μ M]. La Figura 12B muestra una imagen representativa del efecto de los inhibidores en la dosis intermedia evaluada mediante microscopia confocal.

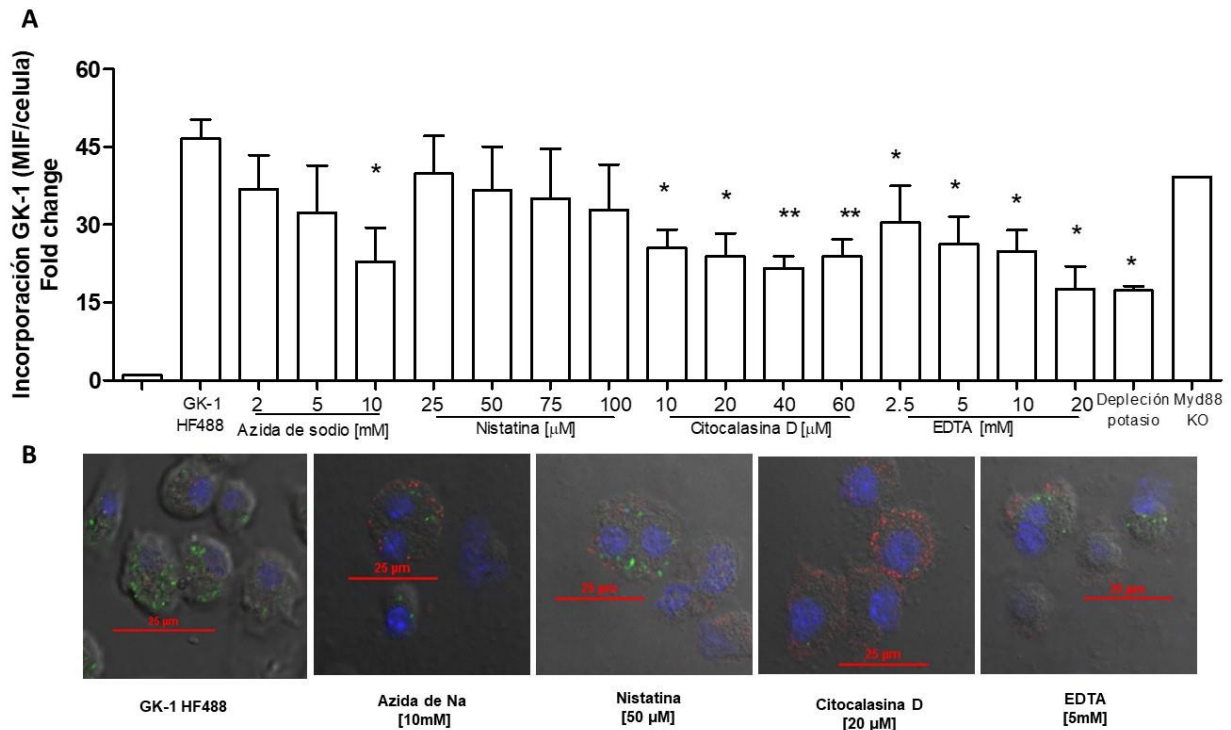


Figura 12. GK-1 entra en las células dendríticas mediante endocitosis. Las BM-DCs se incubaron previamente durante 30 minutos con azida de sodio, nistatina, citocalasina D, EDTA y buffer hipotónico libre de potasio y posteriormente se adicionó el péptido GK-1 HF488 [10 μ M] durante 1 hora a 37°C, con tratamiento posterior con tripsina. A) Media (\pm SEM) de la intensidad media de fluorescencia del péptido marcado (MIF/célula) detectada por citometría de flujo. B) Imagen a 40X representativa de células capturadas en el microscopio confocal Zeiss LSM.

Adicionalmente, considerando que anteriormente se describió que GK-1 activa las BM-DCs a través de TLRs y que se ha reportado que algunos PAMPs pueden ser internalizados junto con los TLRs favoreciendo una respuesta más eficiente, se evaluó si en los ratones KO Myd88 se veía afectada la internalización del péptido. Al respecto, encontramos que la señal mediada por el adaptador Myd88 no influye en la entrada de GK-1 en las células dendríticas (Figura 12A).

Estos resultados en conjunto con los resultados de la eficiencia del péptido como inmunopotenciador en su aplicación como adyuvante y terapia contra cáncer de mama y melanoma, resaltan la importancia de indagar en la seguridad del péptido GK-1 para su posible uso en humanos.

7. Evaluación de la seguridad preclínica del péptido GK-1 sintético

7.1 Hipótesis

La administración del péptido GK-1 no inducirá efectos tóxicos ni mutagénicos en los humanos.

7.2 Objetivo general

Evaluar la seguridad preclínica del péptido GK-1

7.3 Objetivos particulares

- 1) Realizar el estudio subcrónico de toxicidad a dosis repetidas en ratas HsdHan: WIST de ambos sexos por vía subcutánea.
- 2) Realizar los estudios de genotoxicidad (Prueba de Ames, micronúcleos y aberraciones cromosómicas) del péptido GK-1

7.4 Materiales y método

7.4.1 Estudio de toxicidad subcrónica

7.4.1.1 Animales

Para el estudio subcrónico se emplearon ratas (40 hembras y 40 machos) HsdHan: WIST "S.P.F." (Specific Pathogen Free) de 6-8 semanas de edad. Los animales se obtuvieron de la barrera 655 UNAM-Envigo® RMS SA de CV (México). Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas en el Área de experimentación animal de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la UNAM. La temperatura y humedad relativa en el cuarto experimental se mantuvo en $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 40-70%, respectivamente, con ciclos de luz-oscuridad de 12h/12h. Todos los procedimientos se realizaron conforme a la NOM-062-ZOO-1999 y las Buenas Prácticas de Laboratorio y el protocolo fue sometido a la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM.

7.4.1.2 Estudio de toxicidad a dosis repetida

El péptido GK-1 se administró en un esquema a dosis repetidas en los días 1, 7, 14 y 21 por vía subcutánea, empleando tres niveles de dosificación G1 (0.5 mg/kg peso), G2 (5 mg/kg peso), G3 (12.5 mg/kg peso) y G4 (vehículo: solución salina isotónica). Cada grupo incluyó 10 hembras y 10 machos.

Una vez administrado el se realizaron observaciones diarias de todos los animales experimentales para registrar la signología producida por los efectos farmacológicos y toxicológicos, así como de morbilidad y mortalidad a lo largo del estudio.

Los animales se pesaron antes y una vez a la semana después de la administración del péptido para evaluar la ganancia de peso. Además, todos los animales se sangraron antes del tratamiento y a los días 1, 24 y 69 después de la última administración para las pruebas de hemograma y bioquímica. Las muestras se recolectaron en microtubos con heparina para realizar los hemogramas y en microtubos sin anticoagulante para realizar la bioquímica sanguínea.

Para la obtención de los parámetros hematológicos las muestras fueron procesadas en el analizador de hematología KONTROLAB BCVet (DESEGO), donde se obtuvieron los parámetros de hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, volumen globular medio (VGM), concentración globular media de hemoglobina (CGMH) y leucocitos. Posteriormente, se realizó un frotis sanguíneo para realizar el diferencial de leucocitos, estimación plaquetaria y evaluación morfológica de los eritrocitos en un microscopio óptico LEICA.

Para la determinación de parámetros bioquímicos las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos a fin de obtener el suero. El análisis de las muestras se realizó empleando un analizador automatizado de bioquímicas CST-240 y poder establecer o identificar cualquier alteración en los parámetros bioquímicos relacionada a los tratamientos que pudiera incidir en la función renal y hepática. Los analitos determinados fueron urea, creatinina, colesterol, bilirrubina total (BT), fosfatasa alcalina (FA), alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), proteína total (PT) y albúmina (ALB).

Adicionalmente, se tomaron muestras de orina empleando cajas metabólicas que permiten recuperar la orina producida en un periodo de 4 a 6 horas a los días 0, 22, 24 y 90. A las muestras de orina se les realizó una evaluación física en la que se determinó el color, la apariencia y la densidad urinaria, esta última empleando un refractómetro KITLAB. Para la evaluación química se usó el analizador de urianálisis IDEXX VetLab UA para llevar a cabo la lectura en tiras reactivas del pH, proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno y sangre/hemoglobina. En el examen microscópico se evaluó la composición del sedimento urinario, para esto se centrifugó la muestra y se observó en un microscopio óptico LEICA.

Todos los animales fueron sometidos a una necropsia completa a los días 46 ó 91 del protocolo, contemplando 5 hembras y 5 machos de cada grupo por tiempo. La necropsia se realizó lo más pronto posible a partir de que a los animales se les aplicó la eutanasia en una cámara de CO₂. Se colectaron los órganos y tejidos (cerebro, bazo, hígado, riñón, glándulas adrenales, corazón, nódulos linfáticos y piel del sitio de administración) para ser fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina para hacer cortes de 3 µm. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina y las

laminillas fueron analizados en un microscopio LEICA DM500 para registrar lesiones histopatológicas relevantes.

7.4.2 Estudio de genotoxicidad del péptido GK-1

7.4.2.1 Ensayo bacteriano de reversión de mutagenicidad (Prueba de Ames)

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos de la norma OECD 471-1997, empleando la prueba de reversión de mutaciones presentes en distintas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102, TA1535, y TA1537) para reestablecer la capacidad funcional de las bacterias para sintetizar histidina. El péptido GK-1 se solubilizó en una solución de PBS (pH=7.4) al 1% DMSO y se evaluó por triplicado en concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 5 mg/placa.

Los cultivos bacterianos conteniendo 10^8 células se pre-incubaron con el péptido durante 20 minutos a 37°C en presencia o ausencia de activación metabólica mediada por la presencia de una preparación microsomal obtenida de hígado de rata (fracción S9) tratada con NADP y Glucosa-6-fosfato. El tratamiento se mezcló con agar y vertió sobre placas con agar mínimo Vogel-Bonner. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 h y se evaluó el número de bacterias revertantes, es decir, aquellas que pudieron revertir la mutación presente en éstas y crecer en un medio deficiente en histidina. En cada repetición se incluyó un control positivo de inducción de reversión para cada cepa.

7.4.2.2 Ensayo *in vivo* de micronúcleos

Este ensayo se realizó siguiendo los lineamientos de la norma OECD 474-2014. Se utilizaron grupos de 5 ratas Wistar macho de 6 semanas que fueron tratados con tres dosis del péptido GK-1 [0.5, 2.5 y 12.5 mg/kg peso], SSI como vehículo o ciclofosfamida [10 mg/kg peso] como control positivo. El tratamiento fue administrado una vez por vía oral durante dos días consecutivos y las ratas se sacrificaron al tercer día. Se colectó la sangre por punción cardiaca en solución BBS (Buffer salino de boratos, pH=8.2) con heparina (1:1) y se fijaron con metanol ultracongelado a -70°C. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su uso. Las muestras se procesaron de acuerdo con el método desarrollado por Weaver y Torous (2000). Se emplearon los anticuerpos anti-CD71 de rata y anti-mouse/rat CD61 para identificar reticulocitos y plaquetas, respectivamente, así como yoduro de propidio (10 µg/mL) para teñir el DNA de células nucleadas y micronúcleos. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Attune Azul/Violeta (Thermo Scientific) y el análisis de micronúcleos se realizó en la población de eritrocitos y reticulocitos después de eliminar células nucleadas y plaquetas del análisis a partir de 250000 células por cada triplicado.

Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de reticulocitos, de micronúcleos en reticulocitos y en eritrocitos maduros.

7.4.2.3 Prueba de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos

La prueba se realizó conforme los lineamientos de la norma OECD 473-1997 para evaluación de sustancias químicas. Se tomaron muestras de sangre de donadores sanos en tubos heparinizados. Se realizaron cultivos por duplicado de sangre completa con distintas concentraciones de GK-1 (0.001, 0.001, y 0.1 mM) en presencia o ausencia del activador metabólico como se mencionó anteriormente. Para los estudios sin activación metabólica, se realizaron cultivos continuos (es decir que no se retira la sustancia de prueba) de la sangre en medio RPMI suplementado con 0.01 mL L-glutamina, aminoácidos no esenciales y 0.2 mL de fitohemaglutinina. Después de 24 horas de la estimulación mitogénica se adicionó el péptido GK-1 en las distintas concentraciones. Finalmente se adicionó colcemida [1 μ M] dos horas antes de la cosecha después de un cultivo de 72 horas.

Para los cultivos con activación metabólica, la sangre fue tratada durante 2 horas con la fracción S9 y 50 mL del péptido GK-1 en las distintas concentraciones. La fracción S9 y el péptido se retiraron del cultivo 24 horas después mediante centrifugación 1200 rpm por 5 minutos y las células se resuspendieron en medio RPMI con colcemida hasta su cosecha a las 72 horas. Para determinar si la manipulación pudiera incidir en la capacidad proliferativa de los linfocitos, se realizó un duplicado de los experimentos sin el tratamiento con la fracción S9. Como controles se emplearon el medio solo, cis-platino [0.16 mM] en ausencia de activación metabólica o ciclofosfamida [6 μ M] cuando los cultivo fueron tratados con la fracción S9.

En todos los casos las células se cosecharon en una solución hipotónica de KCl [0.07 mM] e incubaron en baño maría a 37 °C durante 20 minutos. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el precipitado celular se resuspendió en solución de fijación (metanol:ácido acético; 3:1) y se prepararon laminillas teñidas con Giemsa para su evaluación al microscopio. En cada laminilla se analizaron 100 metafases con 46 centrómeros para registrar la presencia de aberraciones cromosómicas, cromatídicas y complejas.

7.5 Resultados

7.5.1 Estudio de toxicidad subcrónica

7.5.1.1 Observaciones clínicas

Durante el periodo de estudio no se encontraron signos clínicos aparentes ni muertes asociadas a la administración subcutánea del péptido GK-1. Con relación al peso, la Figura 13 muestra que

no se encontró diferencia significativa en el aumento de peso en función del tiempo tanto en hembras como machos en ninguna de las dosis del péptido administradas comparada con el grupo control (G4); sin embargo, una pérdida de peso significativa (< 6%) se observó en el grupo tratado con la dosis más baja (G1: 0.5 mg/kg peso) sólo al final del experimento. Con relación a la ganancia de peso (final –inicial) por grupo, no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control G4.

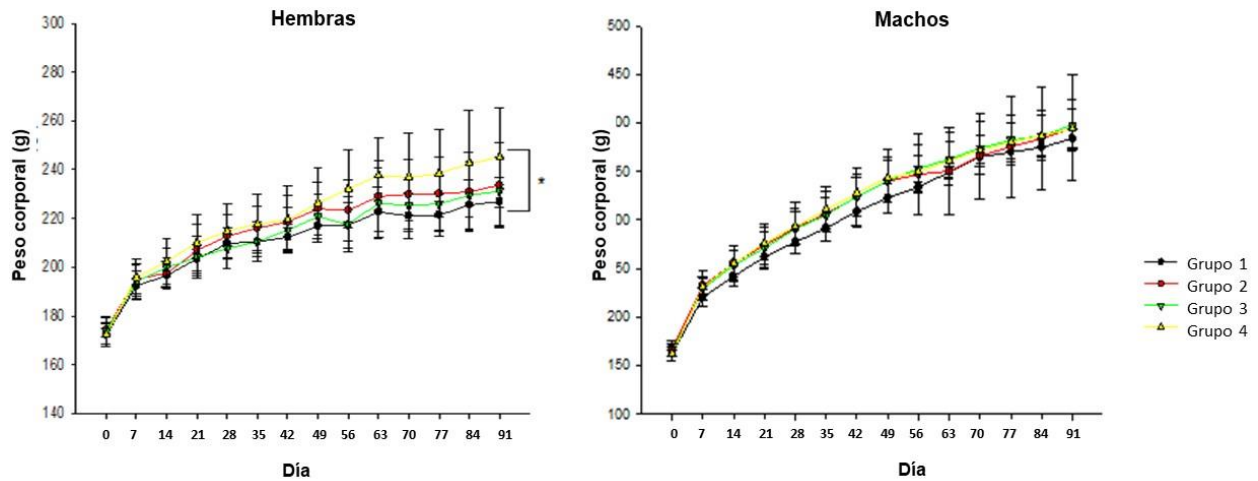


Figura 13. Efecto del GK-1 en el peso de ratas en un estudio de toxicidad subcrónica a 90 días. Se emplearon grupos de 10 ratas de ambos sexos los cuales fueron inoculados a los días 1, 7, 14 y 21 con 0.5 mg/kg peso (grupo 1), 5 mg/kg peso (grupo 2), y 12.5 mg/kg peso (grupo 3) del péptido GK-1 o solo el vehículo (grupo 4). Las flechas indican los tiempos de administración. Los datos muestran la media \pm DS de los pesos semanales registrados para las 10 ratas del grupo a las primeras 7 semanas y 5 ratas de cada grupo para el resto de las semanas. * $P < 0.05$ Grupo 1 vs. Grupo 4.

7.5.1.2 Hemograma, química sanguínea y urianálisis

La Tabla 3 muestra una ligera pero significativa disminución en el hematocrito y concentración de hemoglobina en el grupo de ratas hembra que recibieron la dosis más baja de GK-1 (G1: 0.5 mg/kg peso). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros hematológicos evaluados en los machos en los distintos tratamientos recibidos (Tabla 4). Con relación a los conteos leucocitarios (linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos) no se encontraron diferencias significativas en las distintas dosis del péptido administrado tanto en hembras como en machos a lo largo del estudio (Tablas 3 y 4). Los conteos de neutrófilos se encontraron discretamente aumentados en los grupos 2 (5 mg /kg peso) y G3 (12.5 mg/kg peso) de las ratas hembra (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del péptido GK-1 en los parámetros hematológicos durante el estudio de toxicidad a 90 días (Ratas hembras)

Parámetros	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Hb (g/L)	139.6 ± 5 ^a	145.6 ± 4	144.2 ± 3	147 ± 2.6
HT (L/L)	0.44 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.47 ± 0.01
MCV (μm ³)	56.0 ± 2.0	56.8 ± 2.6	56.2 ± 1.5	56.8 ± 1.9
MCHC (g/L)	312.0 ± 4.5	310.2 ± 3.7	310.2 ± 2.9	309.6 ± 2.6
Eritrocitos (x 10 ¹² /L)	7.96 ± 0.5	8.24 ± 0.4	8.28 ± 0.2	8.32 ± 0.2
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	740.0 ± 117.7	874.6 ± 31.3	806.8 ± 36.3	974.6 ± 58.3
Leucocitos (x 10 ⁹ /L)	4.52 ± 1.9	4.88 ± 1.2	4.260 ± 0.7	3.78 ± 1.3
Conteo leucocitario diferencial				
Neu (x 10 ⁹ /L)	0.22 ± 0.08	0.44 ± 0.2 ^a	0.50 ± 0.25 ^a	0.18 ± 0.04
Lin (x 10 ⁹ /L)	4.26 ± 1.8	4.38 ± 1.2	3.64 ± 0.7	3.54 ± 1.32
Eos (x 10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.08 ± 0.08	0.04 ± 0.05
Mon (x 10 ⁹ /L)	0.04 ± 0.5	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.5	0.02 ± 0.04
Bas (x 10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0

Los datos se muestran como la media ± DS. Los datos se analizaron mediante una prueba t no pareada; ^ap<0.05 Vs. Grupo control (G4). Hb: hemoglobina, HT: hematocrito, MCV: Volumen corpuscular medio, MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media, Neu: Neutrófilos, Lin: Linfocitos, Eos: Eosinófilos, Mon: Monocitos, Bas: Basófilos. CTR=control, y tratamiento con GK-1 a 0.5, 5.0 and 12.5 mg/kg peso.

Tabla 4. Efecto del péptido GK-1 en los parámetros hematológicos durante el estudio de toxicidad a 90 días (Ratas machos)

Parámetros	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Hb (g/L)	148.6 ± 7.2	151.8 ± 7.9	150.6 ± 5	150.8 ± 2.5
HT (L/L)	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.01
MCV (μm ³)	53.8 ± 1.9	53.2 ± 1.8	53.4 ± 0.5	53.2 ± 0.8
MCHC (g/L)	313.6 ± 4.6	315.6 ± 2.1	312.2 ± 5.6	314.4 ± 5.2
Eritrocitos (x 10 ¹² /L)	8.80 ± 0.5	9.04 ± 0.5	9.04 ± 0.4	9.00 ± 0.4
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	531.4 ± 82.2	674.0 ± 306.3	836.2 ± 160.9	835.8 ± 179.2
Leucocitos (x 10 ⁹ /L)	5.64 ± 1.3	6.52 ± 0.7	5.72 ± 1.2	5.68 ± 1.8
Conteo leucocitario diferencial				
Neu (x 10 ⁹ /L)	0.40 ± 0.4	0.460 ± 0.2	0.84 ± 0.8	0.44 ± 0.2
Lin (x 10 ⁹ /L)	5.22 ± 1.2	5.00 ± 1.9	4.84 ± 0.7	5.20 ± 1.7
Eos (x 10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.05
Mon (x 10 ⁹ /L)	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04
Bas (x 10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0

Los datos se muestran como la media ± DS. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA; n.s. para todos los parámetros. Hb: hemoglobina, HT: hematocrito, MCV: Volumen corpuscular medio, MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media, Neu: Neutrófilos, Lin: Linfocitos, Eos: Eosinófilos, Mon: Monocitos, Bas: Basófilos. CTR=control, y tratamiento con GK-1 a 0.5, 5.0 and 12.5 mg/kg peso.

La evaluación de los parámetros bioquímicos en sangre para determinar indirectamente la función del hígado y riñón mostró que no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados para ninguna de las dosis de GK-1 administradas con respecto al grupo control en las ratas hembra (Tabla 5). Sin embargo, si se observa un incremento en los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y glucosa en el grupo de ratas macho administradas con la dosis de 0.5 mg/kg peso (G1) (Tabla 6).

Tabla 5. Efecto de GK-1 en la química sanguínea en un estudio de toxicidad a 90 días (Ratas hembra)

Parámetros	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Pruebas de función de hígado				
ALT (IU/L)	73.0 ± 16.1	71.2 ± 17.1	73.4 ± 16.1	70.4 ± 19.6
AST (IU/L)	132.4 ± 41.2	91.6 ± 15.4	102.8 ± 18.5	104.0 ± 10.1
ALP (IU/L)	106.6 ± 40.9	94.6 ± 45.3	93.4 ± 53.9	75.0 ± 18.0
BTB (µmol/L)	2.78 ± 1.1	2.36 ± 0.3	2.18 ± 0.5	2.64 ± 0.7
Prot total (g/L)	68.4 ± 2.3	71.6 ± 4.9	71.2 ± 4.9	72.0 ± 3.9
Albúmina (g/L)	41.0 ± 2.5	43.0 ± 5.6	41.2 ± 3.1	41.8 ± 2.6
Pruebas de función renal				
Creatinina (µmol/L)	61.6 ± 6.3	56.4 ± 2.5	56.8 ± 2.2	54.0 ± 3.5
Urea (mmol/L)	8.80 ± 1.1	8.10 ± 0.6	8.26 ± 0.6	7.88 ± 0.5
Pruebas de función metabólica				
Glucosa (mmol/L)	9.70 ± 1.2	9.48 ± 0.7	8.62 ± 0.3	8.66 ± 0.6
Colesterol (mmol/L)	2.38 ± 0.4	2.60 ± 0.7	2.22 ± 0.3	1.95 ± 0.4

Los datos representan la media ± DS a los 90 días. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía; n.s. para todos los parámetros. ALT: Alanina Aminotransferasa, AST: Aspartato Aminotransferasa, ALP: Fosfatasa alcalina, BTB: Bilirrubina total en sangre. CTR=control, tratamiento con GK-1 a 0.5, 5.0 y 12.5 mg/kg peso.

Tabla 6. Efecto de GK-1 en la química sanguínea en un estudio de toxicidad a 90 días (Ratas macho)

Parámetros	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Pruebas de función de hígado				
ALT (IU/L)	92.0 ± 17.6 ^a	76.6 ± 9.3	74.0 ± 9.3	67.4 ± 10.7
AST (IU/L)	139.2 ± 41.2	112.0 ± 21.9	119.6 ± 24.3	120.2 ± 28.2
ALP (IU/L)	206.0 ± 57.3	189.8 ± 59.8	174.8 ± 34.3	178.4 ± 22.4
BTB (µmol/L)	2.54 ± 0.2	2.50 ± 0.5	2.52 ± 0.7	2.72 ± 0.7
Prot total (g/L)	69.2 ± 1.9	70.0 ± 3.1	70.6 ± 3.0	69.2 ± 0.2
Albumina (g/L)	38.6 ± 0.9	38.2 ± 1.5	38.6 ± 1.1	38.0 ± 1.6
Pruebas de función renal				
Creatinina (µmol/L)	52.2 ± 3.6	48.6 ± 3.1	51.0 ± 3.3	41.6 ± 3.5
Urea (mmol/L)	7.30 ± 0.6	7.36 ± 0.8	7.00 ± 0.5	6.62 ± 0.5
Pruebas de función metabólica				
Glucosa (mmol/L)	10.00 ± 1.4 ^b	7.26 ± 0.8	7.72 ± 0.8	7.12 ± 0.9
Colesterol (mmol/L)	2.42 ± 0.4	2.52 ± 0.7	2.37 ± 0.2	2.55 ± 0.2

Los datos representan la media \pm DS a los 90 días. Los datos se analizaron mediante prueba T no pareada; ^ap<0.05 Vs. G4 (grupo control) ^bp<0.05 Vs. G4. ALT: Alanina Aminotransferasa, AST: Aspartato Aminotransferasa, ALP: Fosfatasa alcalina, BTB: Bilirrubina total en sangre. CTR=control, tratamiento con GK-1 a 0.5, 5.0 y 12.5 mg/kg peso.

El estudio de urianálisis no mostró diferencias en ninguno de los parámetros evaluados (densidad, pH, proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, eritrocitos, leucocitos) tanto en hembras como machos en ninguna de las concentraciones de GK-1 empleadas (datos no mostrados).

Con respecto al estudio histopatológico realizado al final del estudio (90 días), no se observaron lesiones o rasgos anormales en ninguno de los órganos examinados en las ratas administradas con GK-1 (Figura 14).

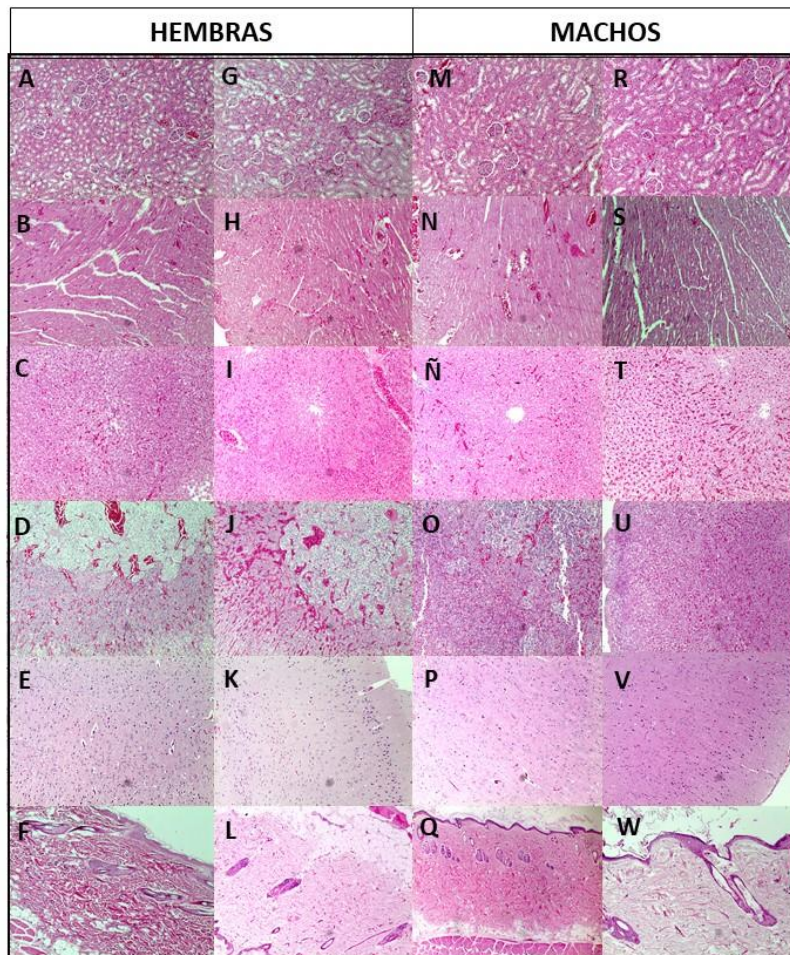


Figura 14. Estudio histopatológico del efecto del péptido GK-1 sobre riñón (A, G, M, R), corazón (B, H, N, S), hígado (C, I, Ñ, T), glándula adrenal (D, J, O, U), cerebro (E, K, P, V), y piel (F, L, Q, W) en ratas a los 90 días del estudio de toxicidad a dosis repetidas. Fotomicrografías representativas de los grupos: controles hembras (A-F) y machos (M-Q), y tratados con GK-1 a 12.5mg/kg peso en ratas hembra (G-L) y macho (R-W). Tinción H&E 10X.

7.5.2 Estudio de genotoxicidad

7.5.2.1 Ensayo bacteriano de reversión de mutagenicidad (Prueba de Ames)

El péptido GK-1 se evaluó hasta una concentración de 5 mg/placa en presencia o ausencia de activación metabólica con la fracción S9. No se encontraron incrementos significativos en el número de colonias revertantes ni una disminución en las unidades formadoras de colonia asociadas a posible toxicidad del péptido para ninguna de las cepas empleadas ni en ninguna de las dosis de GK-1 evaluadas (Tabla 7). Todos los compuestos empleados como control causaron un incremento en el número de colonias revertantes.

Tabla 7. Efecto del péptido GK-1 en cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*

Concentración (mg por placa)	S9 mix	Número de colonias revertantes por placa				
		TA1535	TA100	TA102	TA98	TA1537
0 ^a	+	13 ± 2	122 ± 12	482 ± 28	36 ± 5	35 ± 3
0.125	+	15 ± 2	136 ± 9	462 ± 10	31 ± 6	34 ± 5
0.25	+	10 ± 3	122 ± 10	461 ± 23	30 ± 3	35 ± 5
0.5	+	19 ± 4	122 ± 5	468 ± 22	33 ± 7	39 ± 8
1.0	+	12 ± 3	127 ± 19	464 ± 22	30 ± 8	34 ± 10
5.0	+	19 ± 5	125 ± 23	439 ± 48	26 ± 1	35 ± 7
Control positivo	+	384 ± 36 ^c	2923 ± 466 ^e	2227 ± 141 ^g	498 ± 12	102 ± 11
0 ^a	-	17 ± 3	131 ± 7	411 ± 49	19 ± 7	21 ± 1
0.125	-	18 ± 3	109 ± 3	361 ± 13	24 ± 6	19 ± 1
0.25	-	19 ± 4	121 ± 5	371 ± 15	17 ± 1	21 ± 7
0.5	-	16 ± 3	129 ± 6	325 ± 11	19 ± 2	16 ± 2
1.0	-	19 ± 3	117 ± 12	354 ± 34	18 ± 5	24 ± 12
5.0	-	17 ± 5	117 ± 7	348 ± 20	16 ± 5	25 ± 3
Control positivo	-	1319 ± 8 ^b	1083 ± 67 ^d	1437 ± 121 ^f	457 ± 43	84 ± 15

Datos representados como la Media de número de colonias revertantes por placa ± DS.

^a Colonias revertantes espontáneas; ^bazida de sodio 1ug/placa; ^c2-aminoantraceno 2ug/placa; ^ddácido pricolónico 100ug/placa; ^ebenzo[a]pireno 10ug/placa; ^f4-nitroquinolina-N-óxido 1ug/placa; ^g2-aminoantraceno 5ug/caja

7.5.2.2 Ensayo de micronúcleos *in vivo*

Como se muestra en la Tabla 8, el péptido GK-1 no mostró efecto genotóxico en ninguna de las dosis empleadas en reticulocitos de sangre periférica de ratas a las que se les administró el péptido. Asimismo, no se encontraron cambios en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros en circulación.

Tabla 8. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos y eritrocitos maduros

Tratamiento	% MN en reticulocitos	% MN en eritrocitos maduros
Vehículo (solución salina)	0.37 ± 0.12	0.20 ± 0.05
GK-1, 0.5 mg/kg peso	0.34 ± 0.05	0.16 ± 0.04
GK-1, 2.5 mg/kg peso	0.41 ± 0.13	0.26 ± 0.17
GK-1, 12.5 mg/kg peso	0.44 ± 0.18	0.16 ± 0.05
Ciclofosfamida, 10 mg/kg peso	1.26 ± 0.24	0.44 ± 0.18

Los datos se muestran como la Media ± DS. El análisis estadístico de la frecuencia de micronúcleos se realizó empleando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una significancia de $\alpha < 0.05$.

7.5.2.3 Ensayo de aberraciones cromosómicas

El péptido GK-1 no mostró actividad clastogénica en los cultivos de linfocitos humanos *in vitro*. La Tabla 9 muestra que no hay diferencia significativa en la proporción de células con alguna aberración cromosómica en ninguna de las concentraciones del péptido empleado (0.001-0.1 mM). Por otro lado, el control positivo sí mostró un incremento en el porcentaje de aberraciones inducidas respecto al vehículo.

Tabla 9. Porcentaje de aberraciones cromosómicas bajo distintas condiciones de cultivo

GK-1 Concentración (mM)	Cultivo 24h Con fracción S9	Cultivo 24h Sin fracción S9	Cultivo continuo (72h) sin fracción S9
0	2	2	2
0.001	2	2	1.5
0.01	2	2	2
0.1	3	3	3
Cis-platino		33	47
Ciclofosfamida	9		

8. Discusión

El péptido GK-1 ha demostrado tener propiedades inmunomoduladoras favoreciendo la activación de células dendríticas derivadas de médula ósea en combinación con LPS [Segura-Velázquez et al., 2009] y macrófagos peritoneales (PMΦ) [Sánchez-Hernández et al., 2018]. En este estudio se evaluaron en células dendríticas derivadas de médula ósea los mecanismos involucrados en la activación por GK-1 tales como su capacidad para internalizarse en las células, la participación de las vías MAPK y NF-κB, así como su posible interacción con receptores TLR.

El efecto del péptido GK-1 en la activación BMDCs se realizó con y sin incluir un estímulo inespecífico dado por la estimulación con LPS. Se diferenciaron células dendríticas a partir de los precursores CDP (de las siglas en inglés common-DC progenitor) presentes en médula ósea, empleando el factor GM-CSF que se ha demostrado favorece un fenotipo CD11c⁺ CD11b⁺ MHCII⁺ [Lutz et al., 1999; Castell-Rodríguez et al., 2017]. Por lo cual en este estudio se seleccionó una población con fenotipo CD11c⁺ MHCII⁺ para la evaluación de los marcadores asociados a activación, considerando que este fenotipo nos permite diferenciar células dendríticas maduras de precursores mieloides (CD11c⁺ MHCII⁻), granulocitos (CD11c⁻ MHCII⁻) y monocitos/macrófagos [Lutz et al., 1999].

Los resultados mostraron evidencia de que el péptido GK-1 es capaz de inducir un incremento discreto en la expresión de MHC-II y CD86 en la dosis de 100 µg/mL, el cual se hace más evidente en ambas dosis empleadas (10 y 100 µg/mL) cuando se da un pulso previo con LPS. Anteriormente se había reportado que GK-1 en la dosis de 10 µg/mL incrementaba la expresión de estas moléculas en células dendríticas derivadas de médula ósea, pero solo en combinación con LPS [Segura-Velázquez et al., 2009]. El incremento en la expresión de estas moléculas señala la progresión en el estado de maduración de las células dendríticas inducidas por el péptido que está siendo favorecida por una sinergia o “priming” por el LPS, agonista de TLR4 [Bagchi et al., 2007]. Otros péptidos de bajo peso molecular, como los presentes en el extracto leucocitario de origen humano Transferon®, han mostrado también incrementar la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos diferenciados de monocitos THP-1, sólo cuando el Transferon® se adicionó de forma simultánea con el LPS [Jiménez-Urbe et al., 2019].

La maduración/activación de las células dendríticas implica no solo cambios en la expresión de receptores de la membrana plasmática (receptores Fcγ, receptores de lectinas tipo C, integrinas, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras) sino que contribuye a la respuesta inmune a través de secretar factores solubles como citocinas y quimiocinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, células NK, así como su migración a órganos linfoides favoreciendo la activación de linfocitos T, células NKT y linfocitos

B [Alfaro et al., 2013; Castell-Rodríguez et al., 2017]. Las células dendríticas juegan también un papel importante en el reconocimiento y procesamiento de antígenos en péptidos que son presentados a células T CD4+ o CD8+ vírgenes favoreciendo su activación y diferenciación [Hachimura et al., 2018] por lo que el incremento en su estado de activación por el péptido GK-1 puede también repercutir en una mejor respuesta adaptativa. En este sentido, hemos reportado que el péptido GK-1 es capaz de incrementar la activación de las células dendríticas y favorecer la capacidad proliferativa de LT CD4+ específicas contra la hemaglutinina de la vacuna de influenza [Segura-Velázquez et al., 2009].

Considerando el estado de activación que indujo el péptido GK-1 en las células dendríticas, se evaluó la participación de la cascada de señalización de las MAPK, dado que se ha descrito que la interacción de ligandos específicos de los TLR puede activar esta vía de señalización [Peralva et al., 2013; Chen et al., 2017]. Al respecto, encontramos que GK-1 favoreció la fosforilación de las MAPK p38 y ERK1/2. Las señales generadas por las MAPK promueven cambios en la expresión de genes, que llevan al aumento de moléculas efectoras como las citocinas que son esenciales para la diferenciación de linfocitos T CD4+ en células cooperadoras o reguladoras [Ghosh et al., 1998; Zhang et al., 2001; Soukup et al., 2015]. Este proceso depende de la activación de varios factores de transcripción tales como AP-1, STAT1 y NF- κ B, los cuales se activan por el reconocimiento a través de la señalización de los PRRs. En este sentido se ha reportado que en células dendríticas obtenidas de bazo estimuladas *in vivo* con el agonista de TLR4 (LPS) se favorece la activación de p38, que es crítico en la producción de IL-12(p70) mientras que Pam3CSK4, agonista de TLR2, indujo la señalización a través de ERK1/2 favoreciendo la inducción de IL-10 y así una respuesta Th2 [Dillon et al., 2004].

En el presente estudio no se encontraron niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de las BMDC estimuladas sólo con el péptido GK-1, aunque en estudios previos se reportó que la exposición de las BMDCs al péptido GK-1 + LPS *in vitro*, así como PM Φ estimulados *in vitro* con el péptido favorecían la secreción de mediadores inflamatorios [Segura-Velázquez et al., 2009; Sanchez-Hernández et al., 2018]. Estos resultados señalan que otros factores que pudieran estar presentes *in vivo* sean requeridos para poder inducir moléculas pro-inflamatorias, por lo que se evaluó el perfil de citocinas y quimiocinas en suero y extractos proteicos de bazo de ratones después de ser administrados por vía intravenosa con GK-1. Se encontró que el péptido favoreció la producción de IL-6, IL-12, IL-15 y CCL2 en suero y de IL-6 en bazo. En este sentido, la producción de IL-6 puede estar relacionada con la activación de las vías de MAPK y NF- κ B, como ha sido reportado para otros péptidos como Hp91 e IDR-1002 [Nijnik et al., 2010; Saenz et al.,

2014]. IL-6 se ha encontrado asociada con el reclutamiento de neutrófilos, en el caso de GK-1, se ha reportado que su administración favorece un incremento en los niveles de neutrófilos [Pérez-Torres et al., 2013; Cervantes et al., 2019], lo que podría favorecer su actividad inmunomoduladora junto con la producción de IL-12, IL-15 y CCL2, considerando que en conjunto favorecen el reclutamiento de otras células inmunes importantes en el contexto de cáncer y de inducción de una respuesta adaptativa.

Con relación a la participación de CCL2 en las propiedades inmunomoduladoras de GK-1, se ha reportado que esta quimiocina favorece el reclutamiento e infiltración de monocitos/macrófagos, linfocitos T de memoria y células NK a sitios de inflamación, lo que permite modular la respuesta inmune en contra de distintos agentes infecciosos. Además, se ha demostrado también la participación de CCL2 en la respuesta antitumoral, favoreciendo la capacidad citotóxica de NK en contra de células tumorales e induciendo la expresión de FasL [Deshmane et al., 2009; Bianconi et al., 2018]. Anteriormente, ya se había reportado el incremento de esta quimiocina en los sobrenadantes de cultivo de las BMDCs estimuladas con GK-1+LPS [Segura-Velazquez et al., 2009], sin embargo, se encontró una disminución de esta citocina en los pulmones de ratones con tumor primario inducido por la línea celular 4T1 tratados con GK-1 [Torres-García et al., 2017]. En el presente estudio la administración de GK-1 en ratones sanos indujo también la producción de CCL2, lo que fue indicativo del papel inmunomodulador del péptido. La IL-15 es una citocina producida por distintas estirpes celulares (monocitos, macrófagos, DCs, fibroblastos y células epiteliales) que favorece la proliferación y activación de células que expresan el receptor beta de IL-15 como son las células NK, NKT y LT CD8+ de memoria, incrementando su citotoxicidad y producción de IFN- γ e IFN- α [Guo et al., 2017]. Aunque no se había reportado la inducción de IL-15 favorecida por el péptido GK-1, ésta podría estar asociada a la respuesta antitumoral eficiente del péptido reportada previamente [Pérez-Torres et al. 2013; Torres-García et al., 2017; Rodriguez-Rodriguez et al., 2019], probablemente a través de inducir la proliferación y activación de células NK que son muy importantes en la vigilancia contra infecciones virales y desarrollo de tumores.

Durante el proceso de maduración, las células dendríticas favorecen un perfil pro-inflamatorio caracterizado por la secreción de TNF- α , IL-1 α/β e IL-12 [Soukup et al., 2015]. El rol de la citocina IL-12 en la comunicación entre la respuesta innata y adquirida es muy importante para la promoción de una respuesta celular eficiente [Poudel et al., 2012, 2013]. La IL-12 es una citocina secretada por DCs y macrófagos residentes de tejidos en respuesta a estímulos endógenos y exógenos para promover la inducción de una respuesta Th1 y citotóxica [Teng et al., 2015]. Se ha reportado que la activación de ERK1/2 por el agonista de TLR2 (Pam3SCK4) puede conducir a la regulación negativa de IL-12, mientras que miembros de la familia AP-1 (*fos-jun*, *jun-jun*)

podrían estar regulando la expresión de IL-12 [Dillon et al., 2004], lo que podría explicar que la regulación de la expresión de IL-12 inducida por el péptido GK-1 esté siendo modulada por la activación de ERK1/2. Sin embargo, en un microambiente particular como el inducido en el contexto de cáncer se ha encontrado que GK-1 incrementa significativamente los niveles de IL-12 en el tumor primario [Pérez et al., 2015; Torres-García et al., 2017], lo que podría implicar que la inducción de la respuesta modulada por el péptido puede estar influenciada por las células inflamatorias y/o tumorales reclutadas. El TNF- α es una citocina inflamatoria encargada de promover la necrosis, apoptosis y la expresión de altos niveles de ROS, su producción debe estar muy controlada, por lo que la ausencia en la producción de esta citocina inducida por GK-1 apoya su papel inmunomodulador al no comprometer un proceso de inflamación descontrolada.

Como se mencionó anteriormente, la maduración de las DCs está influenciada por diversos factores como PAMPs o mediadores inflamatorios como las citocinas (IL-1, GM-CSF, TNF- α). Las células dendríticas maduras expresan altos niveles de factores transcripcionales de la familia de NF- κ B, los cuales regulan la expresión de diversos genes de la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que la señalización a través de receptores de TNF (TNF-R) como CD120a/b, CD40 e interacción con factores asociados a TNF-R (TRAF), favorecen la activación de NF- κ B [Banchereau and Steinman, 1998].

La unión de los PAMPs a los receptores TLRs favorece la formación del complejo de señalización compuesto por la proteína adaptadora Myd88, proteínas IRAK y TRAF6, que activa a su vez a las MAPK y al factor NF- κ B, que finalmente conduce a la transcripción de genes inflamatorios [Akira and Takeda, 2004]. En este estudio, además de la activación de las MAPK p38 y ERK1/2, mostramos que el péptido GK-1 indujo la traslocación del factor de transcripción NF- κ B p65 al núcleo desde tiempos tempranos de estímulo. Este factor desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria [Banerjee and Gerondakis, 2007], por lo que la inducción de IL-6, IL-12, IL-15 y CCL2 puede estar asociada a la traslocación de NF- κ B al núcleo [<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>].

En células no estimuladas, el NF- κ B se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B α hasta que ciertos eventos proinflamatorios o infecciosos promueven su liberación y traslocación al núcleo, en donde se une a secuencias específicas de DNA para regular la transcripción de mediadores de la inflamación [Vora et al., 2010; Kawai et al., 2011; <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>]. A excepción del TLR3, la vía de señalización empleada por el resto de los TLRs y miembros de IL-1R para la activación de NF- κ B es dependiente de Myd88 [Kaisho and Akira, 2001]. De esta forma, en este estudio se evaluó el posible rol de la señalización a través de TLR en mediar la activación de NF- κ B mediante el

uso de ratones deficientes en la proteína Myd88 (KO Myd88). En los resultados se observó que la traslocación de NF- κ B disminuyó en las BMDCs de los ratones KO para Myd88 y estimulados con GK-1 y además en estos ratones administrados con GK-1 se vio comprometida la inducción de IL-6 y de la quimiocina CCL2, pero no de IL-15 con respecto a los ratones WT. Se ha reportado que el bloqueo de NF- κ B p65, MAPK p38 o ERK1/2 disminuye *in vivo* de forma importante la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α en el cerebro de ratones infectados con *S. pneumoniae* inducida por la estimulación con B7-H3, proteína coestimuladora miembro de la familia B7 [Chen et al., 2017]. Otros estudios han mostrado una disminución en los niveles de IL-1 β , IL-12 e IP-10 pero no de IL-6 inducidos en ratones deficientes de Myd88 en la población CD11b+F4/80+ inmunizados con OVA (ovoalbúmina) en presencia de agonistas de TLR como PorB y CpG [Mosaheb et al., 2017]. Asimismo, la inducción de IL-6 no se modifica en células dendríticas de ratones deficientes en ERK1 cuando se estimulan con LPS o Pam-3-cys [Dillon et al., 2004]. Sin embargo, se ha reportado también que OVA co-administrada con CpG en DCs deficientes en Myd88 pueden favorecer la inducción de IL-6, pero disminuir la producción de IL-12 e IP-10 [Mosaheb et al., 2017]. La disminución de la expresión de algunos factores proinflamatorios en los ratones Myd88 KO refleja una heterogeneidad en la respuesta inducida por distintos inmunopotenciadores que pueden modular la producción de ciertos mediadores inflamatorios dependiendo de la vía de señalización implicada o de las células del sistema inmune participantes.

La dependencia del adaptador Myd88 para la inducción de la respuesta inflamatoria denota la posible implicación de un TLR como posible receptor de GK-1, responsable de la activación de células presentadoras de antígenos como son los macrófagos y las células dendríticas [Segura-Velázquez et al., 2009; Sánchez-Hernández et al., 2018], así como de la mayor expresión de la transcripción de TLR2 inducido en macrófagos peritoneales estimulados con GK-1 [Sánchez-Hernández et al., 2018].

Además, la composición del péptido GK-1 pudiera estar jugando un papel importante en su capacidad inmunomoduladora, ya que comprende el 22% de residuos de prolina, lo que podría asociar su comportamiento al reportado para péptidos ricos en prolinas (PRP por las siglas en inglés de Proline-rich Peptides). Se ha descrito que estos péptidos favorecen las interacciones moleculares debido a su capacidad para adquirir diversas conformaciones y de esta manera ser reconocidos por ciertos dominios, como SH3 y WW, que activan diversos eventos celulares, como las cascadas de señalización tirosina cinasa que involucran entre otros, la activación de las vías PI3K, MAPK y NF- κ B [Wong, 2005; Vitali, 2015].

Considerando que la traslocación de NF- κ B en las BMDC de ratones deficientes en Myd88 se muestra menos disminuida en la dosis de 100 μ g del péptido GK-1, al respecto se ha reportado que algunos ligandos y patógenos son capaces de internalizarse mediante la cooperación de TLRs con otros receptores o moléculas adaptadoras, como en el caso de la endocitosis de Pam3CSK4 y *Borrelia burgdorferi*, mediado por la integrina $\alpha_3\beta_1$ para contribuir al reconocimiento por el heterodímero TLR2/1 [Marre et al., 2010]. Además, se ha reportado la capacidad de péptidos de bajo peso molecular para atravesar la membrana plasmática [Madani et al., 2011 Milletti et al., 2011] por lo que evaluamos si el péptido GK-1 era capaz de ser internalizado en las células dendríticas.

Para eliminar la posibilidad de que durante la evaluación por citometría de flujo se cuantificara el péptido unido a la superficie celular, se llevó a cabo un tratamiento con tripsina, que se ha reportado que junto con el tratamiento con soluciones ácidas disminuye el riesgo de evaluar un péptido no internalizado [Richard et al., 2003; Mulcahy et al., 2014]. Si bien no hubo diferencia significativa en la disminución de la intensidad media de fluorescencia del péptido en las células CD11c+ tratadas con tripsina con respecto a las no tratadas, se continuó el estudio realizando este tratamiento. Además, se encontró que el péptido GK-1 es capaz de internalizarse en las BMDCs por un mecanismo independiente de energía, sin embargo, la entrada más eficiente es a través de un mecanismo dependiente de energía como la endocitosis. En ambos casos, al aumentar la concentración del péptido se incrementa su presencia en la célula y esto puede deberse a que se favorece la entrada por traslocación directa del péptido al emplear concentraciones superiores a 10 μ M, que se ha reportado favorece la formación de poros transitorios [Trabulo et al., 2010]. Por otro lado, se ha reportado que la capacidad de las células para internalizar vesículas extracelulares disminuye a 4°C y que la captura es un proceso dependiente de energía relativamente rápido, ya que las vesículas se encuentran en el interior de las células desde los 15 minutos [Mulcahy et al., 2014; Saenz et al., 2014], tal como lo reportamos para el péptido GK-1. La endocitosis puede ser clasificada en dos categorías, fagocitosis y pinocitosis. Mientras que la primera está restringida a células especializadas como los macrófagos, la pinocitosis ocurre en todos los tipos celulares y se divide en macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina (EDC) y endocitosis independiente de clatrina (EIC) [Vercauteren et al., 2010]. La EDC es el mecanismo más descrito e involucra la internalización de moléculas en un proceso dinámico que ocurre dentro de los 20 a 90 segundos de la generación de la vesícula, siendo un proceso saturable, pero no competitivo [Wolfe and Trejo, 2007]. En el caso de GK-1 encontramos que su internalización en las BMDCs se satura a partir de los 45 minutos, lo que refuerza aún más que se trate de un mecanismo mediado por endocitosis.

Para discernir el mecanismo de endocitosis empleado por el péptido GK-1, se emplearon métodos como la citometría de flujo y microscopia confocal en presencia o ausencia de diversos inhibidores de endocitosis. En términos generales demostramos que la entrada de GK-1 en las células si es un proceso mediado por endocitosis al verse disminuida su captura al 1) reducir el ATP de las células con azida de sodio [Richard et al., 2003], 2) despolimerizar los filamentos de actina necesarios durante los procesos endocíticos con citocalasina D [Mulcahy et al., 2014], 3) reducir el calcio mediante el uso de EDTA, incidiendo posiblemente en un mecanismo de captura mediado por receptores de lectinas tipo C [Zhang et al., 2010; Mulcahy et al., 2014]. Por otro lado, se demostró que la entrada de GK-1 está mediada por un mecanismo EDC al verse comprometida su entrada al reducir el potasio, que elimina las redes de clatrina asociadas al interior de la membrana plasmática [Hansen et al., 1993; Vercauteren et al., 2010]. Por otro lado, no se vio afectada su entrada empleando nistatina, inhibidor de endocitosis mediado por caveolinas [Saenz et al., 2014]. Estos resultados señalan claramente que el GK-1 está ingresando a la célula a través de un receptor, lo que podría contribuir a su capacidad inmunopotenciadora, tal como se ha visto para otros péptidos inmunomoduladores.

Se ha reportado que el LPS y el péptido Hp91, derivado de la alarmina HMGB1, son capaces de señalar vía TLR4 y posteriormente ser endocitados con el receptor para activar a IRF3 [Kagan et al., 2008; Kawai and Akira, 2011; Saenz et al., 2014]. De igual forma, ligandos de TLR2 presentes en *B. burgdorferi* son endocitados mediante la interacción de integrinas y TLR2, favoreciendo de esta forma una señal más eficiente para la inducción de citocinas proinflamatorias [Marre et al., 2010]. Considerando que GK-1 puede estar señalizando a través de su interacción con un receptor dependiente de MyD88 como TLR, evaluamos si esta señal podía favorecer la entrada del péptido a las BMDCs. Al respecto encontramos que en los ratones Myd88 KO no se afecta la entrada de GK-1, lo que sugiere que al menos la señal dependiente de Myd88 no se requiere para ingresar a la célula, aunque no descartamos la posibilidad de que se endocite con el propio TLR, mecanismo dependiente de clatrininas [Marre et al., 2010].

Las evidencias reportadas acerca de las propiedades inmunomoduladoras del péptido GK-1 permiten proponer su posible uso en humanos, por lo cual fue necesario evaluar su seguridad en un estudio preclínico en animales. Estos estudios se realizaron siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), guías emitidas por la OCDE para la ejecución de ensayos preclínicos [Genoma España, 2012]. La definición de los ensayos toxicológicos a realizar es altamente dependiente del producto y de su aplicación, así como de la fase clínica a la que tiene que dar cobertura [Genoma España, 2012].

Considerando que se trata de un inmunopotenciador con propiedades adyuvantes, los estudios se basaron principalmente en las guías de la Organización Mundial de la Salud “Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, 2013” y el Anexo 1 de “WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, 2005” que especifican realizar las pruebas de toxicidad y genotoxicidad para nuevos adyuvantes. Sin embargo, se tomaron también consideraciones de la guía ICH M3(R2) “Non clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals” que especifica los requerimientos en cuanto al tipo y duración de los estudios necesarios durante el desarrollo de un medicamento. El seleccionar las pruebas adecuadas, la vía de administración y el régimen de dosificación permite poder estimar los posibles efectos adversos que pudieran ocurrir durante los ensayos clínicos [FDA, 2010]. El péptido GK-1 se sometió a un estudio de toxicidad subcrónica a 90 días, el cual permite evaluar los efectos acumulativos en órganos blanco después de la exposición prolongada permitiendo determinar la dosis segura [Medina et al., 2009; Deshpande et al., 2016]. Adicionalmente, se recomiendan estudios de toxicidad a dosis repetidas para vacunas y adyuvantes cuando se requieren dosis múltiples en su uso clínico e incluso se recomienda aún en los casos donde solo se administran dosis únicas [CPMP, 1997; Zhang et al., 2017]. Considerando el interés de emplear a GK1 como adyuvante e inmunomodulador, se evaluó un esquema a dosis repetidas del péptido GK-1.

Al evaluar la seguridad del péptido GK-1, los datos sobre su dosis efectiva como adyuvante [Segura-Velázquez 2006] proporcionó la información inicial para seleccionar los niveles de dosis para el estudio de toxicidad. En este tipo de estudios, el cambio en el peso corporal de los animales se emplea como indicador de posibles efectos adversos de medicamentos [Tofovic and Jackson, 1999]. Al respecto, encontramos cambios significantes en el peso corporal al final del estudio en el grupo de hembras administradas con la dosis más baja del péptido (Grupo1) respecto al grupo control (Grupo 4). Sin embargo, un incremento proporcional en el peso corporal en función del tiempo se observó en todos los grupos, sin encontrar cambios significativos en el aumento de peso neto (final-inicial) por grupo. Considerando esto se puede concluir que la administración de GK-1 no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de las ratas. La evaluación de los parámetros hematológicos se puede utilizar para evaluar la toxicidad de un fármaco, ya que los cambios en el sistema hematopoyético han demostrado un alto valor predictivo en humanos y animales [WHO, 2005; Deshpande et al., 2016]. Se observó una disminución en los valores de hemoglobina y hematocrito en el grupo 1 (GK-1 a 0.5 mg/kg peso) de hembras con respecto al grupo de control; sin embargo, estas alteraciones no son relevantes, ya que los valores medios para ambos parámetros están dentro de los intervalos de referencia para las ratas

[León et al., 2011]. Además, estas diferencias están relacionadas con la edad de las ratas [Ahluwalia et al., 2000] y solo se observaron en el último muestreo de los animales.

GK-1 indujo un aumento en los niveles de neutrófilos después de las administraciones repetidas. Considerando que no se encontraron reacciones locales en el sitio de inyección y de acuerdo con el análisis histopatológico en donde no se observó infiltración de neutrófilos en otros tejidos (cerebro, bazo, hígado, riñón), este aumento puede estar relacionado con las propiedades adyuvantes de GK- 1, promoviendo el transporte de antígeno desde el sitio de inyección a los ganglios linfáticos, favoreciendo la actividad de APC como se ha sugerido previamente para otros estímulos [de Veer et al., 2010; Kolaczowska and Kubes, 2013], así como a la producción de IL-6 reportada en este estudio.

Por otro lado, las diferencias observadas en el contenido de plaquetas en las ratas de ambos sexos son atribuibles a la agregación plaquetaria y se encuentran por debajo de los valores de referencia [Kampfman et al., 2012]. Todos estos hallazgos indican que GK-1 no tuvo efectos no deseables en las células sanguíneas circulantes (Tablas 3 y 4).

Se han identificado varios parámetros para evaluar la patología clínica asociados con la toxicidad de fármacos en los principales órganos blanco (hígado, riñón, corazón) que se aplican de forma rutinaria. A nivel molecular estos parámetros de química clínica se basan en actividades enzimáticas o metabolitos endógenos que se cuantifican en suero u orina por métodos bioquímicos [Muller and Dieterle, 2009]. La magnitud (y la duración) del cambio dinámico en el nivel de estos biomarcadores considerados toxicológicamente significativos debe interpretarse en conjunto con el estudio histopatológico correspondiente [Muller and Dieterle, 2009].

El hígado es el órgano principal donde se metabolizan los agentes exógenos y endógenos. Cualquier daño al hígado provoca un aumento de los niveles sanguíneos de sustancias y enzimas tales como la ALT, AST, glucosa y colesterol [Hu et al., 2014; Zhang et al., 2017]. Cuando se administró a la dosis más baja (0.5 mg / kg), GK-1 indujo un aumento en los niveles de ALT y glucosa con respecto al grupo de control en ratas macho (Tabla 6). Sin embargo, el valor medio no excedió los intervalos de referencia y el aumento medio se debió a un solo animal al final del estudio. Por otro lado, el examen histopatológico del hígado de todos los animales en estudio reveló una discreta congestión hepática correspondiente a la eutanasia aplicada a los animales mediante asfixia por CO₂, no relacionada con el protocolo experimental ni asociada a los niveles elevados de ALT y glucosa. Ninguna otra dosis evaluada mostró este aumento. La función renal no se vio afectada por la administración de GK-1 a ningún nivel de dosis. La seguridad del péptido GK-1 en la toxicidad sobre la función de los órganos se correlacionó con los hallazgos histológicos. Las fotomicrografías de secciones de varios órganos no mostraron alteraciones en la estructura celular ni cambios patológicos.

Finalmente, en este estudio se evaluó el potencial genotóxico de GK-1. Este parámetro es útil para evaluar la seguridad de medicamentos o nuevos adyuvantes de vacunas, ya que algunas sustancias pueden conducir a la carcinogénesis [WHO, 2005], especialmente considerando la producción sintética del péptido [Thybaud et al., 2016]. Tomando en cuenta que la Fase clínica I se limita a un número pequeño de voluntarios, solo se requieren resultados de las pruebas *in vitro* de mutagénesis bacteriana y estudios en células de mamífero en cultivo [Genoma España, 2012]. Sin embargo, basados en la selección de baterías sugeridas por la guía ICH S2(R1), se seleccionaron tres ensayos diferentes, el ensayo de mutación inversa bacteriana (prueba de Ames), la prueba de micronúcleos y el ensayo de daño cromosómico para evaluar la genotoxicidad del péptido GK-1. Se ha reconocido la prueba de aberraciones cromosómicas como un biomarcador importante de la exposición humana a los productos químicos genotóxicos. Se ha reportado que los metabolitos secretados por varios parásitos (como *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum* y *Toxocara canis*) tienen un efecto mutagénico en las células somáticas y generativas del ratón [Bekish, 2001]. A pesar de ser de origen helmíntico, GK-1 no indujo aberraciones cromosómicas directamente (sin activación metabólica) ni a través de metabolitos intermedios mutagénicos activos (con activadores metabólicos).

Con respecto a la medición de micronúcleos en eritrocitos y reticulocitos como marcador de daño citogenético, se encontró que aún en la dosis más alta empleada (12.5 mg/kg peso), el GK-1 no indujo reticulocitos micronucleados. Adicional a estos resultados, las observaciones previas sobre las BM-DCs cultivadas con el péptido GK-1 fluorescente mostraron que el péptido se encuentra dentro de las células, pero no se localiza junto con los núcleos celulares teñidos con DAPI. Finalmente, GK-1 no induce mutagénesis como se observa mediante el ensayo de mutación inversa bacteriana (prueba de Ames).

Los resultados obtenidos durante el estudio preclínico de GK-1 eran esperados considerando que éste, aunque es producido sintéticamente, se deriva de una proteína parasitaria que contiene aminoácidos naturales [Bobes et al., 2017], una condición que pronostica su falta de toxicidad y genotoxicidad [Genoma España, 2012; Vitali, 2015; Thybaud et al., 2016].

El creciente conocimiento sobre cómo el sistema inmunitario interactúa para combatir procesos asociados a procesos infecciosos o condiciones de inmunosupresión está conduciendo a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas empleando como herramienta la modulación del propio sistema inmune, lo cual requiere de una extensa evaluación de los mecanismos de acción, así como de la seguridad preclínica.

Este trabajo demostró que la respuesta observada previamente sobre las APC está asociada a la activación de las vías de señalización MAPK y NF- κ B, dependiente del adaptador Myd88, lo que sugiere la posible interacción de GK-1 con receptores TLR y que se traduce en la inducción de una respuesta inmune innata y adaptativa eficiente. Adicionalmente, se demostró la seguridad del péptido GK-1 a través de una evaluación de toxicidad subcutánea subcrónica, así como los estudios de genotoxicidad indicaron que el péptido no induce mutagenicidad.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro C, Oñate C, Rodríguez A, Pérez-Gracia JL, Fernández de Sanmamed M, Melero I. 2013. Specialized dendritic cells in cross-presentation of exogenous antigens to cytotoxic T lymphocytes. *An Sist Sanit Navar*. 36(3):519-37.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Review. *Nat Immunol*. 2(8):675-80.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Review. *Nat Rev Immunol*. 4(7):499-511.
- Ariotti N, Fernández-Rojo MA, Zhou Y, Hill MM, Rodkey TL, Inder KL, Tanner LB, Wenk MR, Hancock JF, Parton RG. (2014). Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling. *J Cell Biol*. 204(5):777-92.
- Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C, Hellman J. 2007. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol*. 178(2):1164-71.
- Banerjee A, Gerondakis S. 2007. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol*. 85(6):420-4.
- Beedanagari S, Vulimiri SV, Bhatia S, Mahadevan B (2014). Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. Chapter 43, *Biomarkers in Toxicology*. R. Gupta (Ed): Elsevier.
- Bianconi V, Sahebkar A, Atkin S.L., Pirro M. (2018). The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr Opin Hematol* 25: 44-51.
- Bobes RJ, Navarrete-Perea J, Ochoa-Leyva A, Anaya VH, Hernández M, Cervantes-Torres J, Estrada K, Sánchez-Lopez F, Soberón X, Rosas G, Nunes CM, García-Varela M, Sotelo-Mundo RR, López-Zavala AA, Gevorkian G, Acero G, Laclette JP, Fragoso G, Scitutto E (2017). Experimental and theoretical approaches to investigate the immunogenicity of *Taenia solium* derived KE7 antigen. *Infect Immun* 85:e00395-17.
- Brooks NA, et al., 2010. Cell-penetrating peptides: application in vaccine delivery. *Biochim Biophys Acta*. 1805(1):25-34
- Bustamante C. 2001. Fases del desarrollo de un nuevo fármaco. En: Ardila E, Sánchez R, Echeverry R. *Estrategias de investigación en medicina clínica*. El Manual Moderno. Bogota. Capítulo 12, págs. 123-134.
- Campbell, JD. 2017. Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study. Christopher B. Fox (ed.), *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1494, Chapter 2.
- Castell-Rodríguez A, Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez M, Jarquín-Yáñez K, Medina-Solares I.

Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. Chapter 2, Biology of Myelomonocytic Cells, IntechOpen May 2017. DOI: 10.5772/intechopen.68352.

Cervantes-Torres J, Segura-Velázquez R, Padilla P, Sciutto E, Fragoso G. (2017). High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1060:97-102

Chen X Meng X, Foley NM, Shi X, Liu M, Chai Y, Li Y, Redmond HP, Wang J, Wang JH. (2017). Activation of the TLR2-mediated downstream signaling pathways NF- κ B and MAPK is responsible for B7-H3-augmented inflammatory response during *S. pneumoniae* infection. *J Neuroimmunol.* 310:82-90. Coffman RL, Sher A, Seder RA. 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33(4):492-503.

CPMP. Preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines CPMP/SWP/465/95. London: CPMP; 1997.

CPMP. Guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. CPMP/SWP/2145/00. London: CPMP 2001.

Deguine J, Barton GM. (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000 Prime Rep.* 6:97.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29(6):313-26. doi: 10.1089/jir.2008.0027.

Deshpande P., Mohan V., Thakurdesai P. 2016. Preclinical safety assessment of glycosides based standardized fenugreek seeds extract: Acute, subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 6(09): 179-188.

Diaz A., Villalobos N., Aluja A., Rosas G., Gómez-Conde E., Hernández P., Larralde C., Sciutto E and Fragoso G (2003). Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93:81-90

Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol.* 172(8):4733-43.

Dong JC, Kobinger GP. 2013. Hypothesis driven development of new adjuvants: short peptides as immunomodulators. *Hum Vaccin Immunother.* 9(4):808-11.

Fadel F, El Karoui K, Knebelmann B. 2009. Anti-CTLA4 antibody-induced lupus nephritis. *N Engl J Med.* 361(2):211-2.

FDA Guidance for Industry. M3(R2): Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2010. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>

FDA Guidance for Industry. Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2011.

Fountzilias G, Kirkwood JM. 2006. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med.* 354(7):709-18.

Franco D, Giraldo Mónica, Patiño P. 2004. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. *Rev Col Cienc Pec* 17: 280-289.

Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, Segura R, Goldbaum FA, Scitutto E, Rosas G. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Jul;18(7):1067-76.

Freund J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc.* 1956;(10):130-48.

Garlapati S, Facci M, Polewicz M, Strom S, Babiuk LA, Mutwiri G, Hancock RE, Elliott MR, Gerdts V. 2009. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol.* 128:184-91.

Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Gnjatic S, Sawhney NB, Bhardwaj N. 2010. Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J.* 16(4):382-91.

Genoma España. Guía de desarrollos preclínicos. 10 aniversario (2002-2012).

Guo Y, Luan L, Patil N.K., Sherwood E.R. (2017). Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine Growth Factor Rev* 38:10-21.

Hachimura S, Mamoru Totsuka M, Hosono A (2018). Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82 (4): 584-599.

Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol.* 121(1):61-72.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991;18(4):277-91.

Hernández-Esquivel MA, Pérez-Torres A, Romero-Romero L, Reyes-Matute A, Loaiza B, Mellado-Sánchez G, Pavón L, Medina-Rivero E, Pestell RG, Pérez-Tapia SM, Velasco-Velázquez MA. 2018. The dialyzable leukocyte extract TransferonTM inhibits tumor growth and brain metastasis in a murine model of prostate cancer. *Biomed Pharmacother.* 101:938-944.

HogenEsch H, Dunham A, Bulet E, Lu F, Mosley YC, Morefield G. 2017. Preclinical safety study of a recombinant *Streptococcus pyogenes* vaccine formulated with aluminum adjuvant. *J Appl Toxicol.* 37(2):222-230.

Holbrook BC, D'Agostino RB Jr, Parks GD, Alexander-Miller MA. 2016. Adjuvanting an inactivated influenza vaccine with flagellin improves the function and quantity of the long-term antibody response in a nonhuman primate neonate model. *Vaccine* 34(39):4712-4717.

Hu Z, Feng R, Xiang F, Song X, Yin Z, Zhang C, Zhao X, Jia R, Chen Z, Li L, Yin L, Liang X, He C, Shu G, Lv C, Zhao L, Ye G, Shi F. (2014). Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of eucalyptus oil-water emulsions. *Int J Clin Exp Med.* 7(12):4835-45.

Hubbard S.A., Brooks T.M., Gonzalez L.P., Bridges J.W. (1985) Preparation and Characterisation of S9 Fractions. In: Parry J.M., Arlett C.F. (eds) *Comparative Genetic Toxicology*. Palgrave Macmillan, London

ICH. Guideline M3(R2): Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals, CPMP/ICH/286/95 [Internet]. Geneva, Switzerland: International Council for Harmonisation; 2010 [cited February 11, 2013].

Janssens S, Burns K, Vercammen E, Tschopp J, Beyaert R. (2003). MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett.* 2003 Jul 31;548(1-3):103-7.

Juliano RL, Carver K. 2015. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.*87:35-45

Jiménez-Urbe AP, Valencia-Martínez H, Carballo-Uicab G, Vallejo-Castillo L, Medina-Rivero E, Chacón-Salinas R, Pavón L, Velasco-Velázquez MA, Mellado-Sánchez G, Estrada-Parra S, Pérez-Tapia SM. 2019. CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *J Immunol Res.* 2019:2198508.

Kaisho T., Akira S. 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 22: 78-83

Kalenik BM, Góra-Sochacka A, Sirko A. 2018. B-defensins - Underestimated peptides in influenza combat. *Virus Res.* 247:10-14.

Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. Review. *Cell Death Differ.* 13(5):816-25.

Kawai T., Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-650

Klinman DM. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. Review. *Nat Rev Immunol.* 4(4):249-58.

Köberlin MS, Heinz LX, Superti-Furga G. 2016. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Curr Opin Cell Biol.* 39:28-36.

Kubinak JL Petersen C, Stephens WZ, Soto R, Bake E, O'Connell RM, Round JL. 2015. MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host Microbe* 17(2):153-63.

Lang T, Mansell A. 2007. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol.* 85(6):425-34.

Langley J, Frenette L, Ferguson L, Riff D, Sheldon E, Risi G, Johnson C, Li P, Kenney R, Innis B, Fries L. 2010. Safety and Cross-Reactive Immunogenicity of Candidate AS03-Adjuvanted Prepandemic H5N1 Influenza Vaccines: A Randomized Controlled Phase 1/2 Trial in Adults. *The Journal of Infectious Diseases* 201(11):1644–1653.

León C, Blanco D, Peña A, et al. 2011. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *REDVET.* 12:1–10. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111101.pdf>

Li H, Nookala S, Re F. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol.* 178(8):5271-6.

Li S, Couet J, Lisanti MP. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 271(46):29182-90.

Lindgren M and Langel Ü. 2011. Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptide, Chapter 1. *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols.* Springer Methods 2011, vol. 683. Langel Ü (editor). DOI 10.1007/978-1-60761-919-2_1

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223(1):77-92

Madani F, et al., 2011. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J Biophys.* 2011:414729

Maker AV, Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Haworth LR, Levy C, Kleiner D, Mavroukakis SA, Yellin M, Rosenberg SA. 2005. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12(12):1005-16.

Medina MF, Arencibia DF, López Y, et al. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay [Experimental designs for preclinical toxicology studies at the Finlay Institute]. *Rev. Toxicol. Linea* 2003. Available from: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/24004.pdf

Medina-Rivero E, Vallejo-Castillo L, Vázquez-Leyva S, Pérez-Sánchez G, Favari L, Velasco-Velázquez M, Estrada-Parra S, Pavón L, Pérez-Tapia SM. 2016. Physicochemical Characteristics of Transferon™ Batches. *Biomed Res Int*. 2016:7935181.

Medzhitov R. 2009. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*. 30(6):766-75.

Manoutcharian K., Larralde C., Aluja A., Fragoso G., Rosas G., Hernández M., Villalobos N., Rodarte L.F., Govezensky T., Baca M. and Sciutto E. (1995) Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccine Cold Spring Harbor*. P. 63-68.

Manoutcharian K; Rosas G; Hernández M; Fragoso G; Aluja A; Villalobos N; Rodarte L.F.; Sciutto E (1996). Cisticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol*. 82: 250-254

Maritzen T, Schachtner H, Legler DF. 2015. On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cell Mol Life Sci*. 72(11):2119-34.

Medina MF, Arencibia DF, López Y, et al. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay. [Experimental designs for preclinical toxicology studies at the Finlay Institute]. *Rev Toxicol Linea*. 2009; 24:40–54. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/24004.pdf

Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(6):500-13

Mookherjee N, Lippert DN, Hamill P, Falsafi R, Nijnik A, Kindrachuk J, Pistolic J, Gardy J, Miri P, Naseer M, Foster LJ, Hancock RE. Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. *J Immunol*. 2009;183(4):2688-96.

Mosaheb MM, Reiser ML, Wetzler LM. 2017. Toll-Like Receptor Ligand-Based Vaccine Adjuvants Require Intact MyD88 Signaling in Antigen-Presenting Cells for Germinal Center Formation and Antibody Production. *Front Immunol*. 8:225.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641.

Muller P.Y, Dieterle F. 2009. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 5(9):1023-1038

Nesslany F (2017). The current limitations of in vitro genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation. *Food Chem Toxicol*. 106(Pt B):609-615.

Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, Mayer ML, Mullaly SC, Kindrachuk J, Jenssen H, Hancock RE. 2010. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J Immunol*. 184(5):2539-50.

Núñez J.F, Herrera L, Infante J.F, González P, Pérez V. 2006. Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *Vacchi Monitor* 15(2):5-6.

Offit P and Jew R. 2003. Adjuvants, Additives, or Residuals Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals? *Pediatrics* 112:1394-7.

OECD. Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD 2018.

OECD. Test No. 471: bacterial reverse mutation, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1997.

OECD. Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1997.

Ohadian Moghadam S, Nowroozi MR. 2019. Toll-like receptors: The role in bladder cancer development, progression and immunotherapy. *Scand J Immunol.* e12818. doi: 10.1111/sji.12818.

Olafsdottir TA, Lingnau K, Nagy E, Jonsdottir I. 2009. IC31, a two-component novel adjuvant mixed with a conjugate vaccine enhances protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice. *Scand J Immunol.* 69(3):194-202.

O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M. 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng.* 18(3):69-85.

O'Neill LA. 2009. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 226:10-8

Pablo A (2007). Estudio de la capacidad de activación de S3Pvac en células presentadoras de antígeno. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México.

Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, Estrada-Bárceñas D. 2013. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm.* 28(9):682-90.

Pérez-Torres A Vera-Aguilera J, Sahaza JH, Vera-Aguilera C, Moreno-Aguilera E, Pulido-Camarillo E, Nuñez-Ochoa L, Jeganathan P. 2015. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biother & Radiopharm* 30: 247-254.

Peroval M. Y., A. C. Boyd, J. R. Young, and A. L. Smith. 2013. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One.* 8: e51243.

Petrovsky N, Aguilar JC Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004;82(5):488-96. Review.

Pichichero M. 2008. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. *Human Vaccines* 4:262-270.

Poudel B, Ki HH, Lee YM, Kim DK. 2013. Induction of IL-12 production by the activation of discoidin domain receptor 2 via NF- κ B and JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 434(3):584-8.

Ramot Y, Rosenstock M, Klinger E, Bursztyn D, Nyska A, Shinar DM. Comparative long-term preclinical safety evaluation of two glatiramoid compounds (glatiramer Acetate, Copaxone(R), and TV-5010, protiramer) in rats and monkeys. *Toxicol Pathol.* 40(1):40-54.

Rassy D1, Bobes RJ, Rosas G, Anaya VH, Brehm K, Hernández B, Cervantes J, Pedraza S, Morales J, Villalobos N, de Aluja AS, Lacleste JP, Nunes CM, Biondi GF, Fragoso G, Hernández M, Sciotto E. Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. *PLoS One.* 2010 Jun 23;5(6):e11287.

Rech AJ, Vonderheide RH. 2009. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1174:99-106.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 30(1):23-32.

Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV and Lebleu B. 2003. Cell-penetrating Peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 278(1):585–590

Roberti MP, Rocca YS, Amat M, Pampena MB, Loza J, Coló F, Fabiano V, Loza CM, Arriaga JM, Bianchini M, Barrio MM, Bravo AI, Domenichini E, Chacón R, Mordoh J, Levy EM. 2012. IL-2- or IL-15-activated NK cells enhance Cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 136(3):659-71.

Rüegg C, Hasmim M, Lejeune FJ, Alghisi GC (2006). Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta* 1765(2):155-77.

Saenz R, Futralan D, Leutenez L, Eekhout F, Fecteau JF, Sundelius S, Sundqvist S, Larsson M, Hayashi T, Minev B, Carson D, Esener S, Messmer B1, Messmer D. 2014. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Transl Med* 12: 211 DOI: 10.1186/1479-5876-12-211

Safari D, Dekkera H, Rijkersb G, Snippe H. 2011. Codelivery of adjuvants at the primary immunization site is essential for evoking a robust immune response to neoglycoconjugates. *Vaccine* 29:849–854

Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jönsson M, Eklund E, Busch S, Belting M. 2004. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J Biol Chem.* 279(17):17951-6.

Schellack C, Prinz K, Egyed A, Fritz JH, Wittmann B, Ginzler M, Swatosch G, Zauner W, Kast C, Akira S, von Gabain A, Buschle M, Lingnau K. 2006. IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 24(26):5461-72.

Segura-Velázquez R, et al., 2006. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine.* 24:1073-1080.

Segura-Velázquez R, et al., 2009. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 16:1338-1343.

Shekarian T, Valsesia-Wittmann S, Brody J, Michallet MC, Depil S, Caux C, Marabelle A. 2017. Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. *Ann Oncol.* 28(8):1756-1766.

Soukup K, Halfmann A, Le Bras M, Sahin E, Vittori S, Poyer F, Schuh C, Luger R, Niederreiter B, Haider T, Stoiber D, Blüml S, Schabbauer G, Kotlyarov A, Gaestel M, Felzmann T, Dohnal AM. 2015. The MAPK-Activated Kinase MK2 Attenuates Dendritic Cell-Mediated Th1 Differentiation and Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 195(2):541-52.

Suzuki N, Suzuki S, Saito T. (2005). IRAKs: Key Regulatory Kinases of Innate Immunity. *Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4: 13-20

Tam JC, Jacques DA. 2014. Intracellular immunity: finding the enemy within--how cells recognize and respond to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol.* 96(2):233-44.

Teng M.W., Bowman E.P., McElwee J.J., Smyth M.J., Casanova, J.L., Cooper A.M., Cua D.J. 2015. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* 21: 719-729.

Tofovic SP, Jackson EK. 1999. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33:360–366.

Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, et al. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity* 67(5):2522-2530.

Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra M.L. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Int. J. Morphol.* 31(2):650-657.

Toussi DN, Liu X, Massari P. (2012). The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a Toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Jul;19(7):1093-101. doi: 10.1128/CVI.00236-12. Ülo Langel (ed.), *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 683, DOI 10.1007/978-1-60761-919-2_3, Springer Science+Business Media, LLC 2011

Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MC. 2010. Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3(4):961-993.

Valdez F., Hernandez M., Govezensky T., Fragoso G. And Sciutto E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80(6):931-936.

Ventola CL. 2017. Cancer Immunotherapy, Part 3: Challenges and Future Trends. *Pharmacy and Therapeutics* 42(8): 514–521.

Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K. 2010. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther.* 18(3):561-9.

Verdier F, Morgan L. 2002. Predictive value of pre-clinical work for vaccine safety assessment. *Vaccine* 20(Suppl 1):S21-S23.

Vitali A. 2015. Proline-rich peptides: multifunctional bioactive molecules as new potential therapeutic drugs. *Curr Protein Pept Sci.* 16(2):147-62.

Vonderheide RH, LoRusso PM, Khalil M, Gartner EM, Khaira D, Soulieres D, Dorazio P, Trosko JA, Rüter J, Mariani GL, Usari T, Domchek SM. 2010. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res.* 16(13):3485-94.

Vora, S.; Abbas, A.; Kim, C.J.; Summerfield, T.L.; Kusanovic, J. P.; Iams, J. D.; Romero, R.; Kniss, D.A.; Ackerman, W.E. 4th. 2010. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 8:8.

WHO Technical Report Series No. 927, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, Annex 1. Geneva: WHO; 2005.

WHO Technical Report Series No. 987, WHO guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. Annex 2. Geneva: WHO; 2013.

Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. 2009. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci.* 98(4):1278-316.

- Wolfe BL, Trejo J. 2007. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8(5):462-70.
- Wong WS. 2005. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 5(3):264-71.
- Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci.* 68(13):2161-76.
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Sis San Navarra* 28(2):227-236.
- Zhang M, Hu YH, Sun L. 2010. Identification and molecular analysis of a novel C-type lectin from *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29(1):82-8.
- Zhang Y, Zhu K, Cui H, Liu Y, Lu YF, Pan HW, Zhao HP, Qi L, Yang XD, Zhou HL (2017). Toxicological evaluation of *Oviductus ranae*: Acute, sub-acute and genotoxicity studies in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 203:101-109.

APENDICE I. Desarrollo y validación del método cromatográfico para la identificación y estudio de estabilidad del péptido GK-1

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que consiste en la separación de componentes (por ejemplo, proteínas y péptidos) y su posterior detección. Este método se basa en la interacción de la muestra con una fase móvil líquida y/o gas y una fase estacionaria generalmente sólida [CDER 1994]. Cabe mencionar que existen diversos tipos cromatográficos como por ejemplo cromatografía de gases, capa fina, en papel, etc. que se eligen de acuerdo con las características fisicoquímicas de la muestra. La fase móvil se lleva a una columna en donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. La fase estacionaria utiliza una variedad de columnas de acuerdo al tamaño de la partícula (diámetro de partícula 3, 5, 10 μm) y existen diferentes materiales que se emplean como material de empaque (ejemplo la sílice) [Jandera et al., 2011]. Un tamaño de partícula pequeño permite que la superficie de la columna sea mucho mayor y por lo tanto, aumente las interacciones entre la fase estacionaria y las moléculas que fluyen a través de ésta. La fase móvil consiste en un fluido que permite la elución de la muestra a través de la columna; para que la fase móvil fluya en la columna se emplea una bomba que genera altas presiones, lo que permite obtener tiempos de análisis reducidos. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de pasar los componentes por la fase estacionaria y separarse, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

Generalmente, el papel esencial de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante. El proceso de inyección de la muestra en la actualidad es de forma automática, las columnas que se utilizan normalmente son de acero inoxidable y el papel de los detectores es indicar el momento de aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra y calificarlo tanto cuantitativamente como cualitativamente [McNair, Monografía científica de la OEA].

En la cromatografía de fase reversa (RP) la fase estacionaria está constituida por una fase no polar inmovilizada sobre un sólido inerte (cadenas de hidrocarburos, principalmente de 18 y 8 carbonos) y la fase móvil es un líquido polar. En este caso, los compuestos polares interaccionarán con la fase móvil y no con la fase estacionaria como sucede en el HPLC convencional, permitiendo que los compuestos polares pasen con mayor facilidad a través de la columna. El tiempo que tarda un compuesto en pasar a través de la columna al sistema de detección se conoce como tiempo de retención. Este tiempo se mide desde el tiempo en que se

inyecta la muestra y hasta que se detecta un pico [Jandera et al., 2011]. El tiempo de retención de un compuesto puede variar en función de la naturaleza de la fase estacionaria, la composición de la fase móvil, la composición de la muestra, las condiciones de flujo y el tipo de muestra.

Los métodos de detección que se pueden utilizar en la técnica de HPLC son altamente automatizados y extremadamente sensibles. Un método de detección comúnmente utilizado es la absorción de luz ultravioleta (UV) que se basa en la capacidad de los compuestos de absorber la luz UV a diferentes longitudes de onda y la cantidad de luz absorbida depende de la cantidad del compuesto que pasa a través de la columna. Este método emplea principalmente lámparas de deuterio, xenon o wolframio en un rango de longitud de onda de 190 a 900 nm [Hancock 1984]. Otros métodos de detección empleados son la espectrometría de masas (MS), el detector de fotodiodos, el índice de refracción y de fluorescencia. Para este proyecto se empleó un detector de luz UV para el desarrollo del método analítico y la identificación del péptido GK-1.

2. ANTECEDENTES

La cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC) ha sido utilizada como un método para la determinación de la hidrofobicidad de los péptidos con diferentes secuencias de aminoácidos, parámetro crucial en los estudios de estructura e interacciones proteínicas [Shamshurin et al., 2011]. Los péptidos exhiben distintos grados de polaridad y en consecuencia, las condiciones cromatográficas serán distintas para cada molécula. El análisis de péptidos puede dificultarse empleando columnas de fase reversa debido a la baja resolución de las mismas, así como los tiempos de retención prolongados. La adición de sales a la fase móvil favorece el perfil cromatográfico, dado que bloquea las interacciones de la muestra con el material de empaque de la fase estacionaria [Hancock 1984]. Tal es el caso del uso del ácido fosfórico (H_3PO_4) o sales de fosfato en la fase móvil, los cuales facilitan el análisis de varios péptidos permitiendo su detección por luz UV en un intervalo de 200-220nm. Se pueden adicionar también agentes iónicos, aniónicos o no polares en la fase móvil, los cuales interaccionan con los grupos RNH_3^+ de los péptidos. Los agentes iónicos hidrofílicos como el H_3PO_4 incrementan la polaridad de la muestra produciendo una reducción en el tiempo de retención, por lo tanto, son de utilidad para péptidos hidrofóbicos. Por otro lado, los agentes iónicos hidrofóbicos como los alquilsulfonatos (hexanosulfonato de sodio, dodecil sulfato de sodio) incrementan la retención de los péptidos polares. El empleo del ácido trifluoroacético (TFA) en la fase móvil da resultados similares a los obtenidos con H_3PO_4 ; la desventaja que presenta es que debido a su gran acidez disminuye el tiempo de vida de las columnas. En cambio, en columnas no polares, los péptidos polares no son lo suficientemente retenidos para una separación eficiente en presencia de TFA. Sin embargo, debido a su gran volatilidad permite su uso en la purificación de péptidos [Hancock 1984].

El comportamiento cromatográfico de los péptidos está relacionado principalmente a su composición de aminoácidos (aa), sin embargo, se han observado diferentes tiempos de retención para un mismo aminoácido en distintos péptidos [Baczek and Kaliszan, 2009]. La contribución de la secuencia y las propiedades fisicoquímicas del péptido (hidrofobicidad, longitud del péptido) afectan el tiempo de retención de los péptidos en la cromatografía líquida [Baczek and Kaliszan, 2009].

A continuación, se detallan los métodos analíticos desarrollados por distintos grupos de investigación para el análisis cromatográfico de péptidos.

Para la identificación de un conjunto de péptidos con actividad antimicrobiana (AMP) aislados de *Rapana venosa* se empleó una cromatografía de fase reversa con una columna de nucleosil 7 C18 de 10 X 250 mm (Macherey-Nagel, Düren, Germany) y la columna se equilibró con un buffer A de TFA al 0.1% en agua. La elución se realizó en tres pasos empleando 20%, 50% y 80% de solución B (0.08% TFA en acetonitrilo (ACN) al 80%) a una velocidad de flujo de 1.5mL/min. Las determinaciones se realizaron a 280 y 214nm empleando un sistema de absorción UV. Bajo estas condiciones se lograron identificar once fracciones que fluctuaban entre los 3 a 9.5 kDa; la fracción de 9 kDa corresponde a un péptido rico en prolinas cuya secuencia **APPPGYAMESDSFS** (los aminoácidos presentes en el péptido GK-1 se marcan en negritas) y se obtuvo en un tiempo de retención de aproximadamente 40 minutos [Dolashka et al., 2011].

Kelps y cols. (2011) reportan un método analítico para separar tres péptidos estimuladores de dopamina de 5, 11 y 17 aa emplearon un equipo Waters Breeze System acoplado a un detector de UV/VIS de longitud de onda dual. Las muestras se inyectaron en una columna C4 de 4.6 X 75 mm (GRACE/Vydac 214TP54, Deerfield, IL) utilizando una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y con una longitud de onda de 214nm. La fase móvil correspondió a un gradiente acetonitrilo-agua (25:75, v/v) en presencia de TFA al 0.1%. Se logró la separación de los tres péptidos bajo estas condiciones cromatográficas después de 30 minutos. El péptido de 11 aa con la secuencia **PPEAPAEDRSL**-amida (los aminoácidos presentes en el péptido GK-1 se marcan en negritas) eluyeron en un tiempo de retención de 20 minutos.

Kritsch y cols. (2005) establecieron una técnica de separación del complejo IC31 para realizar la identificación y cuantificación del péptido catiónico KLK y el oligonucleótido ODN1a mediante RP-HPLC. El método analítico se realizó en un equipo Alliance 2695 con un detector de longitud dual Waters 2487 (Waters Corp., Milford, MA). Para la identificación del péptido se utilizó una columna Suplex PKB-100 de 4 X 200 mm, 5 µm (Supelco; Bellefonte, PA) empleando un gradiente de 20 mM de ácido metanosulfónico (MSA) y 0.05% TFA en ACN y se empleó una longitud de onda de 225 nm. El péptido KLK se obtuvo en un tiempo de retención de 7.05 min con una buena resolución. El método fue validado obteniendo una exactitud de 98.5% (±1.8%). La linealidad del

método se obtuvo en un intervalo de concentraciones de 0–150 µg/ml de KLK; este intervalo contiene la cantidad de KLK presente en las distintas formulaciones de IC31.

En otro estudio se describió la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) diseñada para la determinación de pidotimod en plasma de humanos. El método fue validado y aplicado para los estudios farmacocinéticos en voluntarios sanos después de la administración oral de pidotimod en tabletas. El método cromatográfico se desarrolló en un sistema ACQUITY UPLCTM (Waters Corp. Milford, MA) empleando una columna Ultimate™ XB-C8 5 µm de 4.6 X 50mm. La fase móvil correspondió a un gradiente de metanol-agua (65:35 v/v) conteniendo 0.5% de ácido fórmico y utilizando un flujo de 0.2 mL/min. El sistema de detección empleó dos canales, el canal 1 para el pidotimod con un tiempo de retención de 3.8 min, y el canal 2 para el estándar interno empleado con un tiempo de retención de 4.0 min. No se observa interferencia entre los compuestos empleando estas condiciones cromatográficas [Zhang et al., 2009].

3. JUSTIFICACIÓN

La cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC) es una herramienta sensible, rápida y selectiva que ha sido utilizada como un método para la identificación y cuantificación de compuestos de interés. En los últimos años el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas provee evidencia de las condiciones óptimas para la administración de un fármaco basado en su comportamiento durante el proceso de elaboración y almacenamiento. Sin embargo, el principal problema que plantea el desarrollo de las nuevas preparaciones farmacéuticas es mantener intacta la estructura de la molécula que puede estar determinada por la influencia de diversos factores fisicoquímicos, y por lo tanto repercute en su eficacia. El desarrollar un método analítico permite la identificación de una molécula en una nueva forma farmacéutica. Por esta razón es necesario desarrollar un método analítico que permita la identificación y cuantificación del péptido GK-1 mediante HPLC de fase reversa. Además, este método será de utilidad para determinar la estabilidad del péptido GK-1.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método analítico que permita identificar y determinar la estabilidad del péptido GK-1.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones cromatográficas del método de HPLC
- Validar los parámetros cromatográficos del método analítico
- Estudiar la estabilidad del péptido sintético GK-1 en solución inyectable

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Péptido GK-1

Se utilizó el péptido sintético GK-1 (lote 79617) sintetizado en la compañía AnaSpec Inc, USA con una pureza mayor al 95%.

5.2. Condiciones cromatográficas

El método cromatográfico se realizó en un sistema Waters 600 Controller, acoplado a un detector de onda variable UV-2075 Plus (Jasco, UK). La columna SunFire de 18 carbonos (C18) de 4.6 x 150mm (Waters Corp. Milford, MA) se empleó para la identificación del péptido GK-1. La fase móvil consistió en una mezcla de solución de Trifluoroacético (TFA) al 0.02% en agua a un pH de 3.5 y Acetonitrilo con una concentración de 0.02% de TFA v/v, la elución del compuesto se hizo por gradiente. Las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 220 nm y se empleó un sistema de adquisición de datos Chrom Perfect, Instrument Interface. En la tabla 1 se resumen las condiciones cromatográficas para la identificación del péptido GK-1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para la identificación de GK1

Columna:	Sunfire C18 5µm de 4.6 x 150mm
Fase móvil A:	TFA al 0.02% (v/v) en H ₂ O
Fase móvil B:	TFA al 0.02% (v/v) en Acetonitrilo (ACN)
Elución:	Gradiente 0-100% de la fase móvil B
Flujo:	1.0mL/min
Volumen de inyección:	10 µL
Equipo de HPLC:	Waters 600 Controller
Detección:	UV-2075 Plus, Intelligent UV/Vis Detector
Longitud de onda:	220nm

5.3. Validación del método analítico

El método de HPLC fue validado para selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud de acuerdo a las guías de validación de los métodos cromatográficos de la FDA [CDER 1994].

Selectividad. Es la habilidad del método analítico para asegurar inequívocamente que la respuesta del compuesto de interés no se ve afectada por otros componentes que pueden estar presentes. En este caso como no se contaba con un estándar de GK-1, se inyectaron muestras que contenían el GK-1 disuelto en solución salina al 0.9% (SSI) en presencia o ausencia de estándar interno. El estándar interno corresponde a un péptido de 12 aa denominado KETc1 cuya secuencia es APMSTPSATSVR y que fue sintetizado por AnaSpec Inc con una pureza mayor al 95% (lote 79616). Para la discriminación del procedimiento se compararon los cromatogramas obtenidos de las muestras que contenían el péptido con respecto a las muestras que no lo incluían; así mismo se utilizó un blanco que sólo contenía el componente de disolución de ambos péptidos (solución salina al 0.9%). El criterio de aceptación es la identificación individual de los picos de cada componente (diferenciando el pico correspondiente al péptido GK-1) y ver que estos no interfirieran entre sí. Además, con esta prueba se determinó el tiempo de retención para cada componente.

Linealidad. Es la capacidad del método analítico para producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito (GK-1) dentro de un intervalo dado. Para determinar este parámetro se preparó una curva de calibración con soluciones que contenían cinco niveles de concentración en un intervalo que va de 0.015 a 0.24 mg/mL del péptido GK-1. Este procedimiento se repitió en forma independiente por lo menos 3 veces, tomando como concepto de linealidad el coeficiente de correlación (r^2) obtenido del ajuste de la curva de calibración por medio de una regresión lineal por mínimos cuadrados en el cual se utilizó la concentración como variable "x" y la respuesta como variable "y". La linealidad se acepta si el coeficiente de determinación es mayor o igual a 0.995, debe indicarse la pendiente de la regresión y el intercepto- "y".

Límite de detección. Este parámetro se define como la cantidad mínima del analito (péptido GK-1) que puede ser detectado por el método cromatográfico. Se prepararon muestras de GK-1 a diferentes niveles de concentración (0.001 a 0.015 mg/mL) y se inyectaron por triplicado en el sistema cromatográfico. Para determinar este parámetro se calculó la señal analítica mínima distinguible (S_m) con la siguiente fórmula: $S_m = Y_{bl} + 3 S_{bl}$, donde Y_{bl} es la media del blanco y S_{bl} la desviación estándar del blanco utilizando la ecuación de linealidad. El valor S_m se extrapoló

en la ecuación de la curva de límite de detección El criterio de aceptación corresponde a la concentración mínima a la cual el analito es detectado con una relación 3:1 de la señal de ruido.

Límite de cuantificación. Es definido como la concentración más baja que el método analítico es capaz de detectar y cuantificar con precisión y exactitud. Para determinar este parámetro se utilizó la siguiente fórmula: $S_m = Y_{bl} + 10 S_{bl}$; donde Y_{bl} es la media del blanco, S_{bl} la desviación estándar del blanco utilizando la ecuación de linealidad. El valor S_m se extrapoló en la ecuación de la curva de límite de detección, y se obtuvo el límite de cuantificación en términos de concentración.

Precisión: La precisión es el grado de correspondencia que guardan los resultados cuando el método analítico se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea. Para determinar la precisión en términos de repetibilidad, se realizaron múltiples inyecciones ($n=3$) de tres niveles de concentración (0.025, 0.08, 0.16 mg/mL) de pesadas independientes de GK-1. Como criterio de aceptación para este parámetro se reporta un porcentaje menor o igual al 3% del coeficiente de variación.

Robustez. Se define como la medida de la capacidad del método para permanecer inalterado ante pequeñas, pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando fiabilidad o estabilidad del método durante su empleo. Para determinar este parámetro se comparó el análisis de valoración de GK-1 de acuerdo al método analítico descrito, y se realizó una variación al método modificando el pH de la fase móvil y el flujo (0.8 y 1.2 mL/min). Además, se empleó un gradiente de elución diferente. Se inyectaron por triplicado diferentes concentraciones (0.1 y 0.5 mg/mL) del péptido GK-1 disuelto en DMSO y en la fase móvil. El criterio de aceptación es la diferencia relativa del porcentaje de GK-1 con respecto al porcentaje inicial en cada condición, el cual no debe ser mayor al 2%.

5.4. Estudio de estabilidad

Para evaluar la estabilidad del péptido GK-1 en distintas condiciones de pH y temperatura se empleó el método analítico de HPLC validado anteriormente.

Influencia del pH. Para evaluar la estabilidad de GK-1 los ensayos se llevaron a cabo a 25°C, bajo esta condición se empleó una solución del péptido GK-1 a una concentración de 200 µg/mL en buffer de fosfato 0.2M / ácido cítrico 0.1M ajustando a distintos valores de pH: 2.16, 3.75, 7.2 y 8. Los ensayos se realizaron por duplicado y se identificaron los picos correspondientes al péptido GK-1 y los posibles productos de degradación en distintos tiempos (15, 30 minutos y 5 h).

Además, se evaluó la estabilidad del péptido GK-1 en condiciones de pH extremo llevando a cabo la siguiente metodología:

- Degradación ácida (pH=1). Una alícuota de 40 μ L de la solución stock de GK-1 (1mg/mL) se transfirió a un microtubo de 2mL y se adicionaron 60 μ L de HCl 2 N, se mezcló y se dejó reposar 1 hora. Transcurrido el tiempo, se neutralizó con 165 μ L NaOH 2 N. La concentración final de GK-1 en la muestra posterior a la neutralización (pH=7) fue de 150 μ g/mL. De la misma manera se utilizó un blanco que sólo contenía los componentes de disolución del péptido (agua inyectable y DMSO). Al final la muestra se inyectó en el sistema cromatográfico.

- Degradación básica (pH=14). Una alícuota de 40 μ L de la solución stock de GK-1 se transfirió a un microtubo de 2mL y se adicionaron 60 μ L de NaOH 0.1N, se mezcló y dejó reposar 1 hora. Finalizado este tiempo, se neutralizó con 25 μ L HCl 0.1 N. La concentración final de GK-1 en la muestra posterior a la neutralización (pH=4) fue de 320 μ g/mL. Así mismo, se utilizó un blanco que sólo contenía los componentes de disolución del péptido (agua inyectable y DMSO). Al final la muestra se inyectó en el sistema cromatográfico.

Influencia de la temperatura. Para evaluar este parámetro se estudió la estabilidad del péptido GK-1 a una concentración de 200 μ g/mL y un pH de 7.2, y se sometió a una temperatura de 4, 25 y 40°C. Los ensayos se realizarán por duplicado y se tomaron alícuotas a distintos intervalos de tiempo (30, 60 minutos y 5 h) para obtener diferentes grados de degradación del péptido GK-1.

Estabilidad. Es proveer evidencia documentada de cómo las características fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas de un producto varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz. Para realizar esta prueba una solución stock del péptido GK-1 (1mg/mL) se sometió a dos ciclos de congelación (-20°C) y descongelación (temperatura ambiente) durante 1 h a cada temperatura y a un tercer ciclo de congelación de 12 horas y 1 hora de descongelación. Por otra parte, se prepararon dos soluciones stock de GK-1, una fue almacenada a - 20°C durante 5 meses y la otra a temperatura ambiente durante 10 y 30 días para determinar la estabilidad a largo y corto plazo, respectivamente. Los ensayos se realizaron empleando una concentración de GK-1 de 200 μ g/mL.

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad del péptido bajo condiciones extremas empleando una cámara de humedad y temperatura controlada ubicada en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química de la UNAM. Para lo cual un vial con 5 mg del péptido liofilizado se sometió a la cámara bajo las siguientes condiciones de acuerdo con la NOM-073-SSA1-2005 para nuevas sustancias: 40 °C \pm 2 °C, 75% humedad relativa \pm 5%, durante 3 meses.

Análisis de datos

Para calcular el porcentaje de recobro se realizó una curva de calibración a diferentes niveles de concentración (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL) empleando una solución de GK-1 de reciente preparación, y se calculó el porcentaje de recobro comparando la concentración obtenida en las diferentes condiciones evaluadas en relación con la concentración teórica de las soluciones de trabajo de GK-1, considerada como el 100%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Validación del método cromatográfico

Selectividad. En la Figura 1 se muestran los picos correspondientes al estándar interno KETC1 (tiempo de retención de 9.8 minutos) y al péptido GK-1 (tiempo de retención de 13 minutos), no encontrando interferencia entre ambos picos, lo que indica una buena selectividad del método.

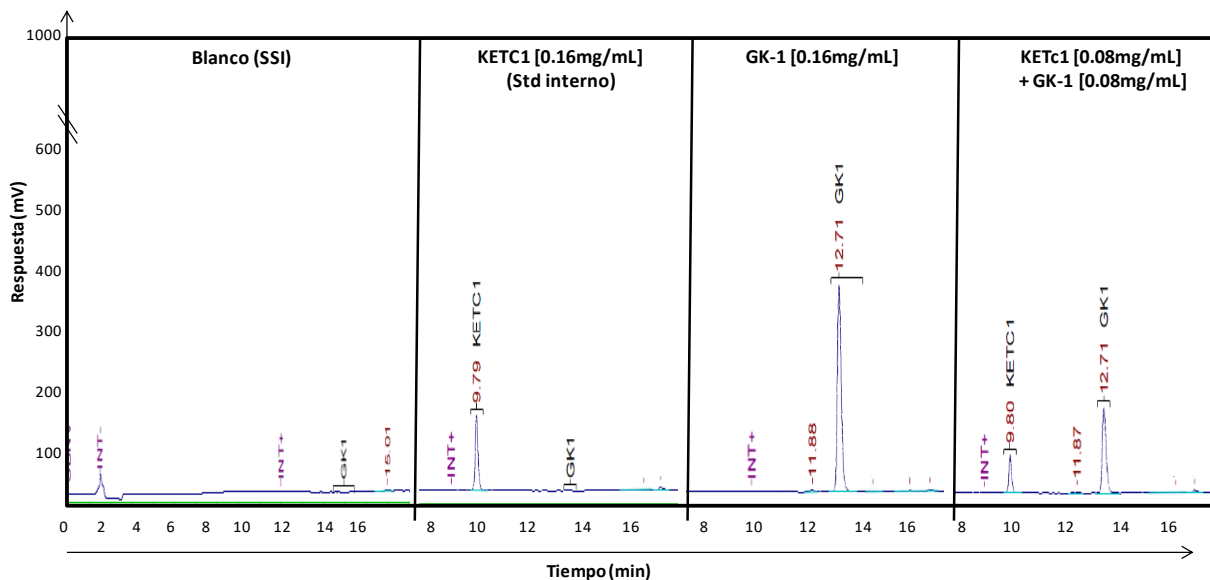


Figura 1. Cromatograma representativo de la selectividad del método en muestras que contienen un blanco (SSI), el estándar interno KETC1 y el péptido GK-1 disueltos en SSI en una concentración de 0.16 mg/mL, y GK-1 en presencia del estándar interno en concentración 0.08mg/mL, respectivamente detectados a una longitud de onda de 220nm.

Linealidad. Para corroborar la linealidad del método se inyectaron por triplicado cinco concentraciones de GK-1 en el intervalo de concentración 0.015 a 0.24 mg/mL. El péptido GK-1 mostró un buen coeficiente de correlación ($r^2=0.9994$) en el rango de concentración evaluado (Figura 2). El valor medio del coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto “y” fueron 0.9993 ± 0.0002 , $1.9441E+7 \pm 0.118$ y 125922 ± 35831 , respectivamente.

Area	Concentración (mg/mL)
4547724 ± 253602	0.24
2219773 ± 110110	0.12
979242 ± 38789	0.06
437670 ± 3205	0.03
226345 ± 20197	0.015

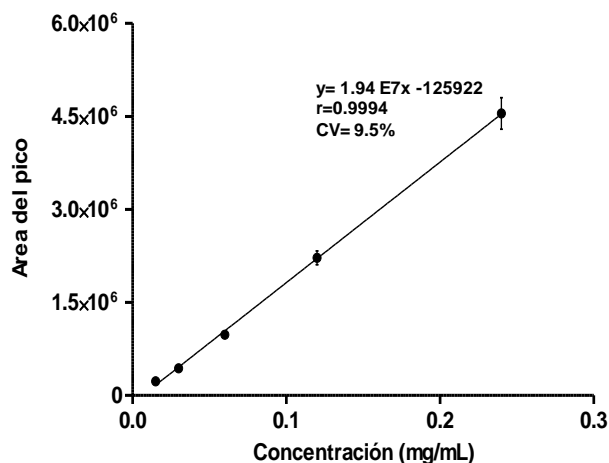


Figura 2. Linealidad del método analítico para identificar GK-1 en el intervalo de concentración 0.015 a 0.24 mg/mL

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Para determinar el LOD y LOQ se realizaron diluciones de una solución stock de GK-1 (1mg/mL) en el intervalo de concentración 0.001 a 0.015 mg/mL. Las muestras se inyectaron por triplicado en el sistema y la señal obtenida de las muestras se comparó con la señal del blanco con una relación 3:1 (LOD) y 10:1 (LOQ). De esta manera se encontró que el límite de detección y cuantificación para el péptido GK-1 es de 0.001 y 0.018 mg/mL, respectivamente (Figura 3).

Area	Concentración (mg/mL)
12314	0.001
52927	0.005
130128	0.01
226345	0.015

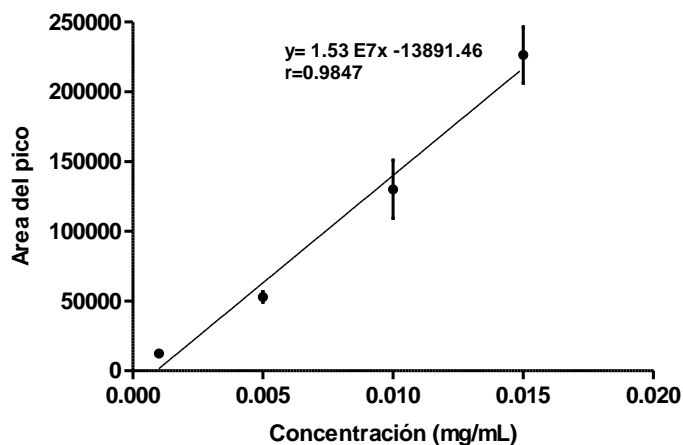


Figura 3. Curva de calibración para determinar límite de detección y cuantificación del método en el intervalo de concentración 0.001 a 0.015 mg/mL

Precisión. La precisión del método se determinó en términos de repetibilidad intra e interdía, realizando nueve determinaciones de concentraciones dentro del intervalo de linealidad. Para ello

se inyectaron por triplicado tres niveles diferentes de concentración (0.025, 0.08, 0.16 mg/mL) de pesadas independientes. La Tabla 1 muestra un coeficiente de variación menor al 3% y un porcentaje de recobro del 100-107% en las tres concentraciones evaluadas, mostrando que el método es preciso y exacto.

Tabla 1. Precisión del método en términos de repetibilidad

Concentración (mg/mL)	Concentración calculada intradía (mg/mL) Media ± SD (n=3)	%CV	Concentración calculada interdía (mg/mL) Media ± SD (n=3)	%CV	% Recobro
0.025	0.028 ± 0.00	0.55	0.026 ± 0.001	1.9	107.7
0.08	0.082 ± 0.001	1.29	0.084 ± 0.003	0.4	104.1
0.16	0.157 ± 0.003	2.22	0.165 ± 0.017	1.03	100.3

Robustez. Se preparó una muestra de GK-1 en una concentración de 0.1 y 0.5 mg/mL y se realizaron deliberadas modificaciones al método analítico que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la evaluación de robustez del método analítico

CONDICIONES INICIALES	CONDICIONES EXPERIMENTALES				
	Gradiente A			Gradiente B	
Fase móvil: TFA 0.02%/H ₂ O y TFA 0.02% / ACN Flujo: 1.0mL/min Gradiente B 220nm	Flujo mL/min		Longitud de onda nm	Dilución de GK-1 en	
	0.8	1.0		DMSO / H ₂ O	Fase móvil TFA /ACN

En la Figura 4 (a-c) se observa que empleando una concentración de 0.5 mg/mL de GK-1 y modificando el gradiente de elución no hay diferencia en los tiempos de retención; sin embargo, cambia drásticamente la intensidad de la señal del pico de GK-1, por lo que bajo estas condiciones el método no es robusto. Por otro lado, empleando el péptido GK-1 en una concentración de 0.1 mg/mL y modificando el flujo de elución (0.8 y 1 mL/min) con el gradiente A (Figura 4d) no se observa diferencia en la intensidad de la señal, pero se modifica ligeramente el tiempo de retención que están dentro de los límites permitidos. En la Figura 4 (e-f) se observa que al modificar el medio de disolución del péptido GK-1 (0.1 mg/mL) no hay diferencia en el tiempo de retención y la intensidad de la señal; por lo tanto, bajo estas condiciones el método analítico es robusto.

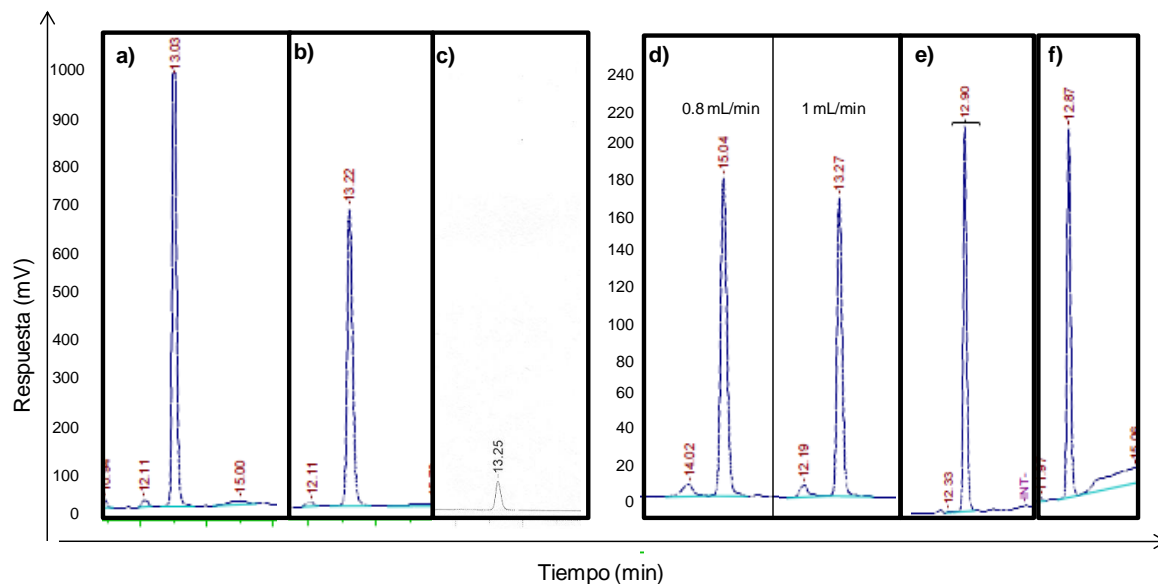


Figura 4. Cromatograma representativo de la robustez del método analítico. Tiempos de retención obtenidos para el péptido GK-1 en concentración 0.5 mg/mL en a) Condición inicial; b) Gradiente A; c) Gradiente A detectado a 240 nm; y para el péptido GK-1 en concentración 0.1 mg/mL en d) Flujo de 0.8 mL/min 1.0 mL/min; e) GK-1 disuelto en DMSO y agua inyectable; f) GK-1 disuelto en la fase móvil (TFA /ACN).

6.2 Estabilidad del péptido GK-1

Influencia del pH

Se estudió el efecto de pH a distintos tiempos (15, 30 minutos y 5 h) para evaluar productos de degradación de GK-1. La Figura 5 (a, c, e, y g) muestra los blancos correspondientes a los distintos buffers con pH de 2.16, 3.75, 7.2 y 8, respectivamente, se observa picos asociados a las distintas concentraciones de las sales presentes en cada buffer a las 5 horas, reproduciéndose el mismo patrón a tiempos menores. Además, se observa un pico obtenido en un tiempo de retención aproximado de 6.5 minutos que corresponde al citrato, el cual va disminuyendo conforme aumenta el pH. En la figura 5 (b, d, f, h) se observan los picos de GK-1 y DMSO en los tiempos esperados, así como los picos identificados en los distintos blancos.

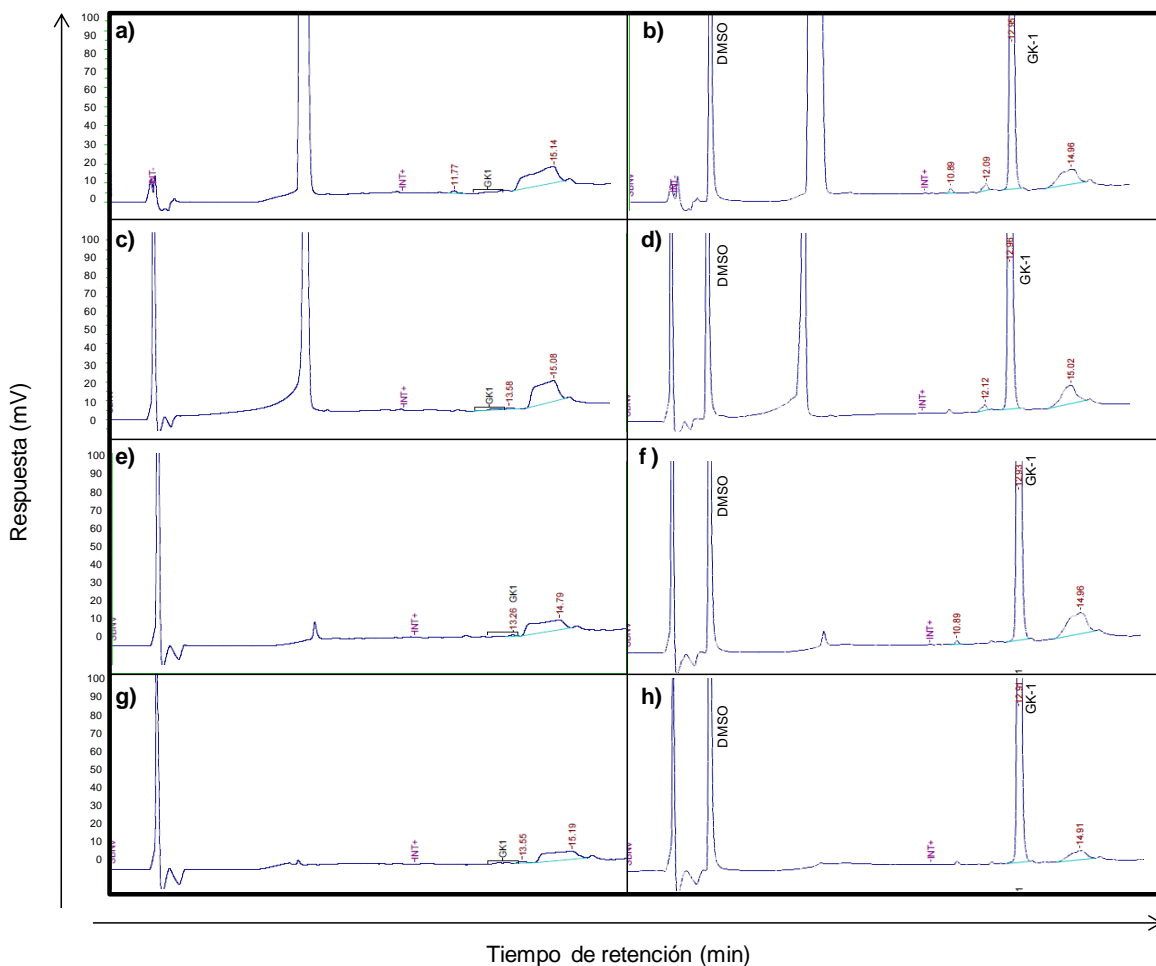


Figura 5. Cromatograma representativo del efecto de pH en un tiempo de 5 horas en muestras que contienen el buffer como blanco (a, c, e, g) y GK-1 disuelto en DMSO (b, d, f, h) en concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, bajo distintos valores de pH: 2.16 (a-b), 3.75 (c-d), 7.2 (e-f), y 8 (g-h).

En la Figura 6 se muestran los cromatogramas obtenidos después de someter al blanco y el péptido GK-1 a una condición de pH ácido extremo después de 1 hora. En el blanco se obtuvieron picos de poca intensidad que corresponden a las sales formadas después del proceso de neutralización; mientras que en la muestra de GK-1 se observan los picos representativos de DMSO y GK-1 (3 y 12.93 minutos). Al comparar ambos cromatogramas no se encontraron evidencias de una posible degradación del péptido bajo esta condición.

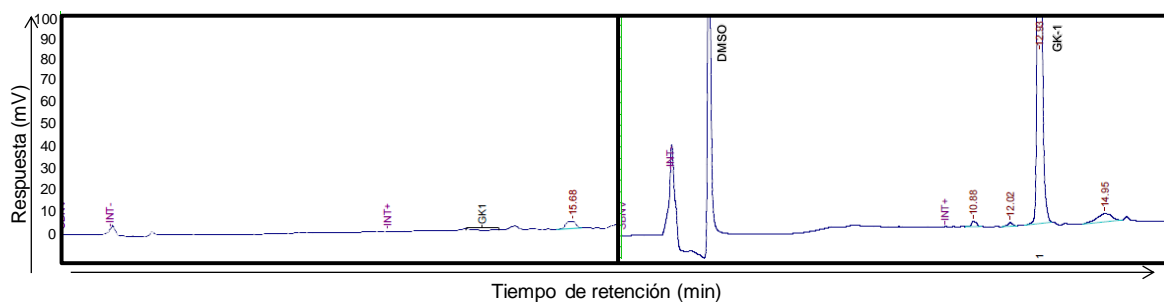


Figura 6. Estabilidad del péptido GK-1 en condición extrema de pH ácido (pH=1). Cromatograma obtenido después de neutralizar la muestra en un pH de 7 y con una concentración final de GK-1 de 150 µg/mL.

En la Figura 7 se representan los cromatogramas del blanco y GK-1 después de someterlos a una condición básica extrema durante un tiempo de 1 hora. En el blanco se obtuvieron señales que corresponden a las sales formadas durante la neutralización, mientras que en el cromatograma de GK-1 se obtuvieron nuevamente los picos para DMSO y GK-1 en los tiempos de retención esperados, observándose una mayor intensidad en los picos identificados en el blanco debido a una posible acumulación de las sales en la columna. Sin embargo, estos resultados sugieren que no existen productos de degradación del péptido.

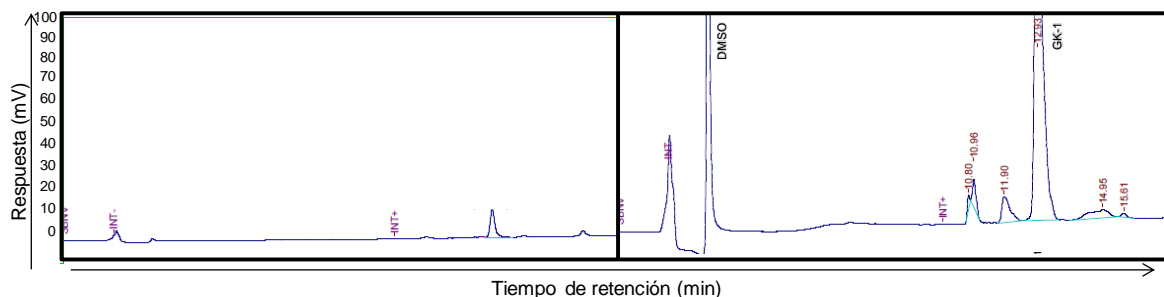


Figura 7. Cromatograma obtenido después de someter al péptido GK-1 a una condición extrema de pH básico (pH=14). La muestra se inyectó después de neutralización en pH=4 y con una concentración final de GK-1 de 320 µg/mL.

Influencia de temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura a distintos tiempos (30, 60 minutos y 5 h) para evaluar la estabilidad de GK-1. En la figura 8 a, c, e se muestran los blancos correspondientes en cada temperatura evaluada 4, 25 y 40 °C, respectivamente, no observándose diferencias en los distintos tiempos evaluados. En la figura 8 (b, d, f) se representan los cromatogramas obtenidos con la muestra de GK-1, en ellos aparecen los picos correspondientes a DMSO y GK-1 a tiempos de retención de 3 y 12.9 minutos (“Protocolo estabilidad GK-1 en solución inyectable”).

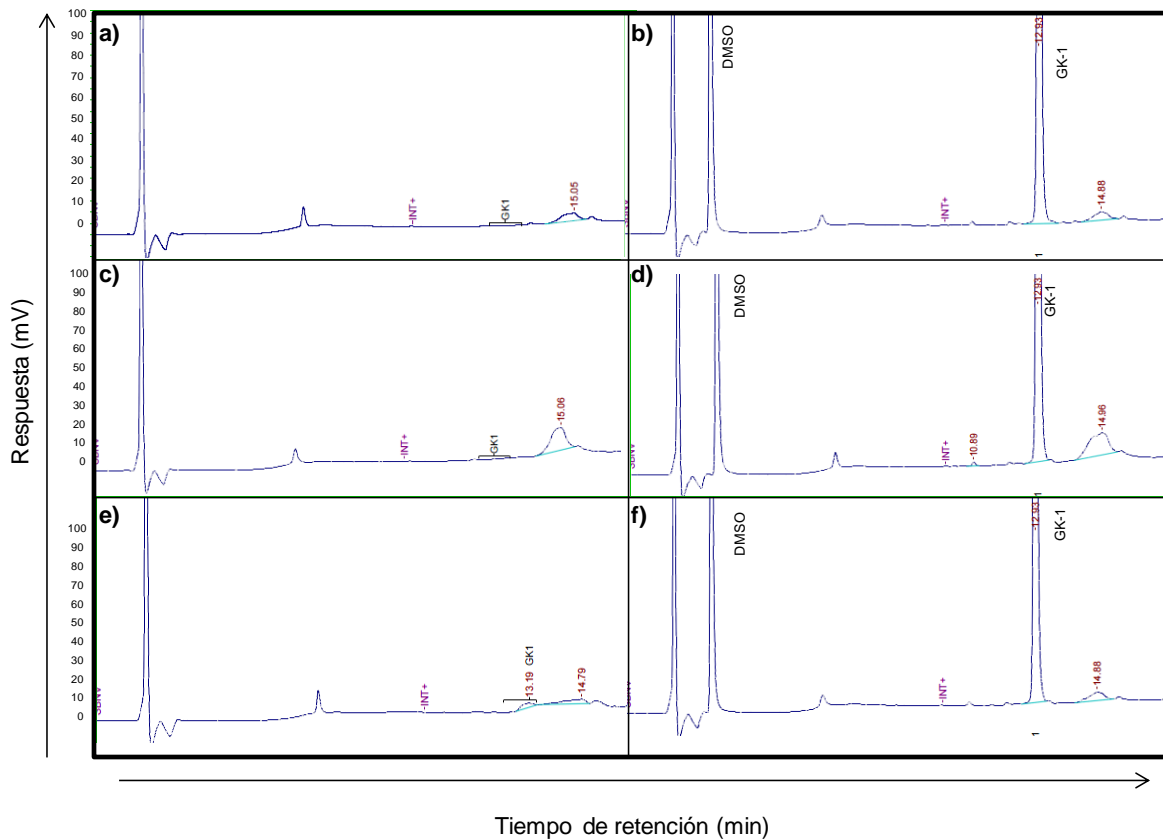


Figura 8. Efecto de la temperatura en la estabilidad de GK-1 determinado en un tiempo de 5 horas en muestras que contienen el buffer como blanco (a, c, e) y GK-1 disuelto en DMSO (b, d, f) en concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, bajo distintos valores de temperatura: 4°C (a-b), 25°C (c-d) y 40°C (e-f).

Estabilidad

La estabilidad del péptido GK-1 se evaluó bajo distintas condiciones de temperatura de almacenamiento (temperatura ambiente, congelación) y sometida a distintos ciclos de congelación y descongelación. En la figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos con la muestra de GK-1, en ellos aparecen los picos correspondientes a DMSO y GK-1 a tiempos de retención de 3 y 12.9 minutos.

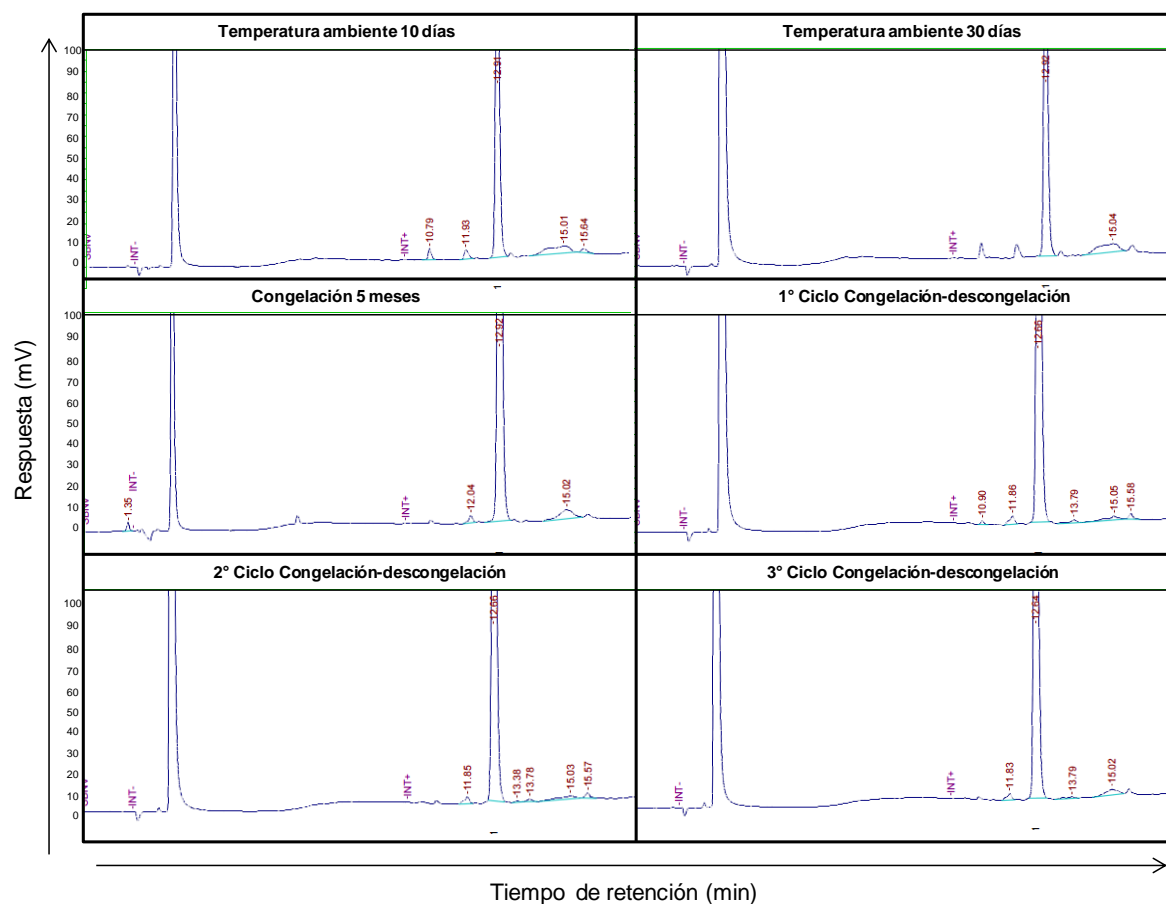


Figura 9. Cromatogramas obtenidos durante el estudio de estabilidad de GK-1 [200 µg/mL] sometido a la influencia de la temperatura durante el almacenamiento

La estabilidad del péptido GK-1 en solución inyectable fue evaluada mediante el método cromatográfico validado, determinando el porcentaje de recobro bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y almacenamiento. El porcentaje de recobro se definió como la suma del área de los picos correspondientes al péptido con respecto a un valor teórico, basado en la concentración conocida de la solución de trabajo. La tabla 1 muestra los porcentajes de recobro obtenidos para el péptido GK-1 bajo las distintas condiciones experimentales. Para la condición de pH, se obtuvo para los valores de pH ácido (2.16 y 3.75) y básico (8.0) un porcentaje de recobro en el intervalo de 83.3 a 88.1% lo que indica que el péptido se degrada ligeramente, mientras que en pH neutro (7.2) se obtuvo un 100% recobro lo que indica que bajo esta condición el péptido es estable.

La estabilidad del péptido bajo la influencia de la temperatura indica que a 25 y 40 °C, el GK-1 se degrada ligeramente obteniéndose un porcentaje de recobro del 88.2 y 86.8%, respectivamente; mientras que a 4 °C se alcanza un 90.8% recobro lo que indica que el péptido se mantiene estable a esta temperatura.

El estudio de estabilidad mostró que el péptido almacenado a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado (10 y 30 días) es altamente degradado, obteniéndose un bajo porcentaje de recobro (36%) con respecto a la misma condición en un periodo corto (5h) (88%). Esto nos sugiere que probablemente la luz sea un factor que degrade el GK-1. El proceso de almacenamiento en congelación prolongada (5 meses) produce una ligera degradación del péptido con un 85.8% recobro. Sin embargo, el péptido GK-1 sometido a varios ciclos de congelación y descongelación se degrada en mayor cantidad conforme aumenta el número de ciclos de 1 a 3, produciendo una disminución en el porcentaje de recobro de 94.9 a 72.7%.

Tabla 1. Porcentaje de recobro en muestras de GK-1 (200 µg/mL) sometidas a distintas condiciones de pH, temperatura y almacenamiento.

Condición experimental	Área bajo la curva (mV) Media ± SD	Concentración obtenida (µg/mL)	% Recobro promedio
pH			
2.16	3246218 ± 93005	166.7	83.3
3.75	3404980 ± 163213	174.6	87.3
7.2	4010793 ± 347839	204.4	102.2
8	3438336 ± 647637	176.3	88.1
Estabilidad a corto plazo			
4 °C	3544200 ± 73924	181.6	90.8
25 °C	3440993 ± 159800	176.4	88.2
40 °C	3386641 ± 577701	173.7	86.8
Estabilidad prolongada			
TA, 10 días	1346598 ± 11575	72.1	36.1
TA, 30 días	1513576 ± 43937	72.3	36.1
Congelación, 5 meses	3346167 ± 104010	171.1	85.8
Ciclos de congelación-descongelación			
1°	3707919 ± 836813	189.8	94.9
2°	3011390 ± 73924	155	77.5
3°	2822006 ± 89684	145.5	72.7
Estabilidad acelerada	3876683 ± 204563	198.2	99.1

TA= temperatura ambiente.

¹ La concentración teórica de GK-1 durante la degradación ácida y básica corresponde a 150 y 320 µg/mL, respectivamente

Para evaluar si el péptido GK-1 en forma liofilizada también era susceptible a degradarse se sometió a condiciones controladas de temperatura y humedad durante tres meses, encontrándose un alto porcentaje de recobro (99%), demostrando que el péptido en solución es menos estable que la forma liofilizada cuando se somete a temperaturas por encima de los 25°C. Se ha reportado que la incubación de proteínas a altas temperaturas produce la degradación

física de éstas como la agregación, la cual depende de las propiedades de la solución en la que se encuentra la proteína y en donde pequeños cambios como temperatura, concentración de sales, pH, etc pueden desestabilizar a la proteína [Chi et al., 2003].

7. CONCLUSIÓN

Se desarrolló un método analítico capaz de identificar el péptido GK-1 mediante RP-HPLC. El método fue validado de acuerdo con las guías ICH mostrando ser selectivo, rápido, preciso y sensible. Los resultados muestran que el péptido GK-1 en solución es estable a pH neutro, a temperaturas menores a 4°C, pero es susceptible a procesos de congelación-descongelación, mientras que la forma liofilizada es más estable.

El método mostró ser adecuado para el análisis de GK-1 como sustancia activa y los resultados obtenidos proveen información requerida para el desarrollo del producto.

8. BIBLIOGRAFÍA

Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res.* 20(9):1325-36.

Dolashka P, Moshtanska V, Borisova V, Dolashki A, Stevanovic S, Dimanov T, Voelter W. 2011. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides* 32(7):1477-1483

Guidance for industry Q2A, Text on Validation of Analytical Procedure, ICH. November 1996.

Guidance for industry Q2B, Validation of Analytical Procedure: Methodology, ICH. March 1994.

Kelps KA, Turchan-Cholewo J, Hascup ER, Taylor TL, Gash DM, Gerhardt GA, Bradley LH. 2011. Evaluation of the physical and in vitro protective activity of three synthetic peptides derived from the pro- and mature GDNF sequence. *Neuropeptides* 45(3):213-218.

Kritsch CE, Berger A, Heinrich-Cseh C, Bugajska-Schretter A, Zauner W. 2005. Separation and quantification of a novel two-component vaccine adjuvant. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 822(1-2):263-270.

Hancock, W. *Crc handbook of HPLC for the separation of aminoacids, peptides and proteins.* CRC, USA 1984.

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de fármacos y medicamentos Impurities in Drug Substance. Draft Guidance. FDA, CDER. June 1998.

McNair H. M. y Esquivel B.. "Cromatografía líquida de alta presión". Monografía científica de la OEA.

Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. CDER, FDA. November 1994.

Santoveña A., Oliva A., Guzman F., Patarroyo M., Llabrés M., Fariña J.B. 2002. Chromatographic of antimalarial SPf66 peptide using MALDI-TOF, MS, CD and SEC. *J Chrom B*. 766

Shamshurin D, Spicer V, Krokhn OV. 2011. Defining intrinsic hydrophobicity of amino acids' side chains in random coil conformation. Reversed-phase liquid chromatography of designed synthetic peptides vs. random peptide data sets. *J Chromatogr A*. in press

Zhang Y, Xiong Z, Qin F, Lu S, Liu W, Li F. 2009. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pidotimod in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 877: 2566-2570.

APENDICE II. Artículos publicados durante el trabajo de tesis

Jacquelyne Cervantes-Torres, René Segura-Velázquez, Patricia Padilla Cortes, Edda Sciutto, Gladis Fragoso (2017). High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography B* 1060: 97-102.

Cervantes-Torres J, Gracia-Mora I, Segura-Velazquez R, Montero-Montoya R, Espinosa-Aguirre J, E Gonsebatt M, Camacho-Carranza R, Rivera-Huerta M, Sanchez-Bartez F, Tinoco-Méndez M, Ostrosky-Wegman P, Fragoso G, Sciutto E (2019). Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: Absence of subchronic toxicity and mutagenicity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 4:1-10. doi: 10.1080/08923973.2019.1566359

Jacquelyne Cervantes-Torres, Laura Montero-León, Noé Rodríguez, Edda Sciutto, Gladis Fragoso, Diana Torres-García. Understanding the anti-tumor properties mediated by the synthetic peptide GK-1. Chapter 4, *Cancer Survivorship*. IntechOpen January 2019. ISBN: 978-1-78984-907-3. DOI: 10.5772/intechopen.79833

Sánchez-Hernández L, Montero L, Mojica-Espinosa R, Reyes-Grajeda JP, **Cervantes-Torres J**, Parkhouse RM, Fragoso G, Sciutto E (2018). Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. *Immunol Lett.* 201:20-30. doi: 10.1016/j.imlet.2018.10.010

Rodríguez-Rodríguez N, Madera-Salcedo IK, Bugarin-Estrada E, Sánchez-Miranda E, Torres-García D, **Cervantes-Torres J**, Fragoso G, Rosetti F, Crispín JC, Sciutto E (2019). The helminth-derived peptide GK-1 induces an anti-tumoral CD8 T cell response associated with downregulation of the PD-1/PD-L1 pathway. *Clin Immunol.* 2019 Jul 9. pii: S1521-6616(19)30163-9. doi: 10.1016/j.clim.2019.07.006

Laura Montero, **Jacquelyne Cervantes-Torres** Edda Sciutto, Gladis Fragoso. Helminth-derived peptide GK-1 induces Myd88-dependent pro-inflammatory signaling events in bone marrow-derived antigen-presenting cells. *Sometido a Molecular Immunology*



High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method



Jacquelynne Cervantes-Torres^a, René Segura-Velázquez^b, Patricia Padilla^c, Edda Sciutto^a, Gladis Fragoso^{a,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^c Unidad de HPLC, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

HPLC
Validation
GK-1 peptide
Stability

ABSTRACT

The 18-mer anionic peptide GK-1 has been successfully employed to improve the immunogenicity and protective response induced by the influenza vaccine and exhibited some degree of protection against experimental murine melanoma.

In this study, a sensitive and quantitative reversed-phase HPLC method was developed to study GK-1 stability under different pH, temperature and storage time. The analysis was carried out on a Sunfire C18 column with mobile phase of acetonitrile–water containing 0.02% TFA. The detection was performed on an UV/Vis Detector at 220 nm. The method was validated with respect to linearity, limits of detection and quantification, precision and selectivity. The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.015–0.24 mg/mL ($r^2 = 0.99$) with lower limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.001 and 0.018 mg/mL, respectively. The intra- and inter-day precision (relative standard deviation, R.S.D.) values were below 3% at all quality control levels.

Forced degradation studies were conducted by introducing a sample of GK-1 peptide standard solution to different conditions of pH (from 2 to 8), temperature (4, 25 and 40 °C) and storage time (10 days to 6 months). The peptide GK-1 showed to be stable under different ranges of pH and temperature; however it was susceptible to prolonged storage at room temperature.

Results shown in this study sustain the high stability of the GK-1 peptide using a reliable new selective and precise method suitable for its analysis.

1. Introduction

The 18-amino acid peptide named GK-1, a protective epitope derived from the KETc7 protein isolated from a cDNA library of *Taenia crassiceps* [1], has been proved to improve the immunogenicity and protective response induced by influenza vaccine [2]. Although the mechanisms that underlie its effect are not completely identified, it is known that the peptide enhances the humoral and the cellular response through the improvement of the activation of antigen presenting cells [3]. More recently, it was also reported that GK-1 exhibits immunostimulatory activities; i.e., peritumoral injection of GK-1 increased the survival in B16-F10 melanoma tumor-bearing mice,

decreasing tumor growth rate [4]; GK-1 treatment of bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX improves the survival of mice with melanoma [5]. Considering the promising properties of this peptide, a preclinical trial is ongoing in order to consider its eventual use in humans.

An important feature of the GK-1 peptide is its hydrophobic and anionic nature due to the presence of an acidic group (Asp-7), which is critical for aqueous solubility [1]. As part of pre-formulation studies of GK-1, the peptide stability was evaluated under specific environmental conditions (pH, temperature, and storage time).

Protein stability is a particularly relevant issue in the current pharmaceutical practice, and its significance will continue to grow as

Abbreviations: HPLC, high performance liquid chromatography; IS, internal standard; ISS, 0.9% saline solution; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD, relative standard deviation

* Corresponding author.

E-mail address: gladis@unam.mx (G. Fragoso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.027>

Received 22 February 2017; Received in revised form 24 May 2017; Accepted 25 May 2017

Available online 04 June 2017

1570-0232/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

the number of therapeutic protein products in development increases [6]. The development phase of new drug formulations provides evidence on the optimal conditions for drug administration, based on its behavior during manufacturing and storing. However, the main challenge in developing new drug products is to keep the structure of the molecule intact; this could be influenced by several physical-chemical factors that affect the drug efficacy. The development of an analytical method allows the identification and quantification of a molecule in a new dosage form [7,8].

High-performance liquid chromatography (HPLC) is an analytic technique consisting in the separation and subsequent detection of the components in a mixture. This method is based on the interaction of the sample with a liquid or gas mobile phase and a stationary, usually solid, phase [9]. The possibilities for separating and isolating small peptides have been markedly improved by the introduction of reversed-phase (RP) chromatography [10,11]. This method is widely used to determine the hydrophobicity of peptides, a crucial parameter in the studies of protein structure and interactions [12]. Peptides exhibit differing degrees of polarity, and thus chromatographic conditions will be different for each molecule. Adding salts to the mobile phase improves the chromatographic profile by blocking sample interactions with the stationary phase packing material [13]; this is the case of phosphoric acid (H_3PO_4) or phosphate salts added to the mobile phase, which facilitate the analysis of several peptides and allow their detection by UV (200–220 nm). Adding trifluoroacetic acid (TFA) to the mobile phase yields similar results to those obtained with H_3PO_4 , and although it reduces the column lifetime, it is widely used since its high volatility allows peptide purification [13].

Herein we report the development of a systematically optimized and validated RP-HPLC method to demonstrate and characterize the stability of the immunomodulatory GK-1 peptide under different stressed conditions. Our results should facilitate the formulation of GK-1 for future *in vivo* studies.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Deionized (18 M Ω) water and HPLC-grade acetonitrile (ACN) were used to prepare the eluents. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The GK-1 peptide (GYYPSPDPNTFYAPPYSA) was synthesized as GMP product (98% purity) by USV, LTD, Mumbai, India (batch RD0001). KETc1 (I.S., 99.4% purity) was purchased from AnaSpec, Inc. (Fremont, CA).

2.2. Reversed-Phase HPLC

RP-HPLC was performed on a Waters 600 Controller HPLC system equipped with a UV-2075 Plus, Intelligent UV/Vis Detector (Jasco, UK) and controlled by the Chrom Perfect Instrument Interface Software. GK-1 samples were analyzed on a Sunfire C18 column (4.6 \times 150 mm, 5 μm ; Waters Corp., Milford, MA) equilibrated with Buffer A (HPLC-grade water containing 0.02% TFA, pH = 3.5). Elution was performed with a linear gradient of Buffer B (HPLC-grade acetonitrile containing 0.02% TFA) from 7.5–35 min, starting at a Buffer B concentration of 25%, and ending at a Buffer B concentration of 100%, with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. UV absorption was monitored at 220 nm.

2.3. Preparation of standards and quality control samples

Stock solutions of GK-1 peptide and the recombinant *T. crassiceps* antigen from 12 aa length KETc1 peptide employed as an internal standard (IS) [14], were prepared in 0.9% saline solution (ISS) at the concentration of 1 mg/mL. Working solutions were prepared by diluting stock solution to concentrations ranging from 0.001 to 0.1 mg/mL of GK-1 with ISS. In addition, appropriate amount of GK-1 was

dissolved in ISS to give a final concentration of 0.2 mg/mL for the preparation of quality control (QC) samples. RP-HPLC solutions were filtered through a 0.22- μm membrane and used to determine the chromatographic conditions.

2.4. Validation of HPLC method

The method was validated for selectivity, linearity, precision, and extraction recovery according to the ICH guidance [15].

2.4.1. Selectivity

It is the ability of the analytic method to unequivocally ensure that the response from the analyte is not affected by other components that might be present.

To confirm the method's specificity to provide evidence on the quality of the bulk drug, critical separations in chromatography were investigated at an appropriate level on samples containing GK-1 dissolved in ISS, either in presence or absence of the IS. Since there is not a reference standard for the GK-1 peptide, a compound that has similar behavior to the analyte was considered as internal standard (KETc1 peptide). A blank sample containing the solvent for both peptides (ISS) was also included.

2.4.2. Linearity

It is the ability of the analytic method to produce results directly proportional to the analyte (GK-1) concentration in a given interval. For the establishment of this parameter, a calibration curve was plotted using standard solutions containing five GK-1 concentration levels that ranged from 0.015 to 0.24 mg/mL. This procedure was performed in at least three independent experiments, taking as linearity indicator the determination coefficient (r^2) obtained by calculation of a regression line by the method of least squares.

2.4.3. Detection limit (LOD)

This parameter is defined as the lowest amount of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily quantitated. To determine LOD, dilutions from different GK-1 stock solutions ($n = 4$) were made at different concentration levels (0.001–0.015 mg/mL) and injected by triplicate to the chromatographic system. The LOD was calculated based on the equation: $\text{LOD} = 3.3 \sigma/S$, where σ is the standard deviation of y -intercepts of the regression lines (b), and S the slope of the calibration curve of the analyte [15].

2.4.4. Quantitation limit (LOQ)

It is defined as the lowest amount of an analyte in a sample that can be quantitatively determined with acceptable precision and accuracy. The following formula was used to determine this parameter: $\text{LOQ} = 10\sigma/S$, where σ is the standard deviation of y -intercepts of the regression lines of the calibration curve (b), and S the slope of the linearity calibration curve [15].

2.4.5. Precision

It is the degree of correspondence among results when the analytic method is applied repeatedly to several fractions of a homogeneous sample. To determine precision in terms of repeatability, multiple injections ($n = 3$) from three independently weighed GK-1 samples at a known concentration (0.025, 0.08, and 0.16 mg/mL) were analyzed intra- or inter-day. The precision was expressed as the relative standard deviation (R.S.D.), and it should not deviate by more than 15% [15,16].

2.5. Sample preparation for stability testing

Stability testing included chromatographic determinations of peptide recovery. Three separate samples of lyophilized GK-1 peptide were dissolved in ISS at final concentration of 1 mg/mL. Equal amounts of the resulting stock solutions (100 μL) were then subjected to different

treatments and analyzed for each condition/time point combination. The pH-stability profile was generated by mixing different amounts of 0.2 M Na₂HPO₄ with 0.1 M citric acid to obtain the target pH (2.16, 3.75, 7 y 8). Freeze–thaw stability was performed by subjecting GK-1 samples to one to three freeze (–20 °C)–thaw (room temperature) cycles. Samples were stored at –20 °C for 6 months and at ambient temperature for 30 days to determine long-term stability. GK-1 peptide was placed at 4, 25 and 40 °C for 5 h to evaluate short-term stability. All stability testing QC samples were determined by using calibration curve of freshly prepared stock solutions. The percent recovery was defined as the summed area of all relevant peaks relative to the theoretical value (0.2 mg/mL). For the acceptance criteria of stability, the deviation between measured values and nominal values should be within ± 15% [16].

2.5.1. Accelerated stability

To assess the stability of the GK-1 peptide under exaggerated storage conditions, a controlled humidity and temperature chamber located at the Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Chemistry, National University of Mexico was used. A 5-mg sample of lyophilized peptide was subjected to the following study conditions, in accordance to the official method NOM-073-SSA1-2005 for new drug substances: 40 °C ± 2 °C, 75% relative humidity ± 5% RH, for 3 months [17].

3. Results and discussion

GK-1 is a short peptide that synthetically produced, has demonstrated to exhibit immunomodulatory properties. Thus, for its formulation and future use it is necessary to perform several tests to ensure its stability under different stressed conditions [18]. The development of a simple and sensitive assay method to evaluate the peptide stability is therefore required. Several HPLC modes are used for analysis of proteins and peptides [9]. The selection of the chromatographic mode depends on the complexity of sample taking into account the stability, biological activity and possible denaturation of the tertiary structure of proteins or peptides [19]. Reversed-phase gradient chromatography provides useful complementary information to separation of proteins/peptides, differing in the degree of ionization by pH and solvent strength with respect to gradient ion-exchange chromatography [11,20]. In view of this information, a RP-HPLC method capable of quantitate the GK-1 peptide and its stability was developed with a linear gradient, which improved the separation of samples and enhanced its resolution. The TFA proportion in mobile phase, linear gradient of Buffer B and flow rate conditions were optimized to obtain high sensitivity and sample throughput, according to the determination of the parameters: retention time, selectivity and resolution (data not shown). Therefore, the chromatography was performed on a C18 column providing a run time of 35 min per sample.

3.1. Validation of the HPLC method

3.1.1. Selectivity

To assess the process discrimination related to process impurities, solvents or the addition of known compounds, chromatograms obtained from GK-1 peptide-containing samples were compared with samples where it was absent; a blank sample, containing the solvent for both peptides (ISS) was also included. In this case, a specific matrix was not used since pharmacokinetic or formulation studies were not conducted. Fig. 1 shows the peaks corresponding to the KETc1 internal standard (retention time 9.8 min) and the GK-1 peptide (retention time 13 min). Neither interference between both peaks nor the presence of extraneous peaks was observed, indicating a good selectivity of the method.

3.1.2. Linearity

To corroborate the method linearity, samples containing the GK-1

peptide in concentrations ranging from 0.015 to 0.24 mg/mL were injected to the system by triplicate. An acceptable value for the coefficient of determination ($r^2 = 0.9994 \pm 0.0002$) was obtained in the concentration range evaluated (Fig. 2). The mean values for the slope and y-intercept were $1.9441E + 7 \pm 0.118$ and 125922 ± 35831 , respectively.

3.1.3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

To determine LOD and LOQ, specific calibration curves were made in the concentration range 0.001–0.015 mg/mL and 0.015–0.24 mg/mL, respectively from a GK-1 stock solution (1 mg/mL). Samples were injected to the system by triplicate, and LOD and LOQ were calculated according to the equations mentioned above. Thus, a detection limit of 0.001 mg/mL and a quantification limit of 0.018 mg/mL were calculated for the GK-1 peptide with a RSD below 20% (Fig. 3).

3.1.4. Precision

The data of intra- and inter-day precision of the method are given in Table 1. The intra- and inter-day RSD were not more than 3% at the three QC levels, and the average recovery percents of GK-1 were between 100 and 107% for the three concentrations evaluated, indicating acceptable precision of the method.

3.2. Stability of samples

Many manufacturing methods can affect the functional activity of proteins by exposing them to potentially damaging conditions, such as aqueous/organic interfaces, elevated temperatures, hydrophobic surfaces, or detergents. Moreover, upon administration the solid protein becomes hydrated and exposed to physiological conditions within the delivery device for long periods of time [21]. Stability of the GK-1 in injectable solution was assessed chromatographically by determining the recovery percent at three timepoints after different conditions of pH, temperature, and storage time. The percent recovery was defined as the sum of the areas of all relevant peaks relative to the theoretical value, based on the known concentration of the starting solution. Table 2 shows GK-1 percent recovery values obtained under the different experimental conditions. For pH testing, two acidic (2.16 and 3.75) and one basic (8.0) pH values were used; under these conditions, percent recovery ranged from 83.3% to 88.1%, indicating that the peptide is slightly degraded. In contrast, a 100% recovery was obtained in neutral pH (7.2), indicating that the peptide is stable under this condition. Temperature tests indicate that while GK-1 is moderately degraded at 25 °C and 40 °C, obtaining a percent recovery of 88.2% and 86.8%, respectively, a 90.8% recovery was obtained at 4 °C, indicating that the peptide is stable at this temperature.

The stability study showed that the peptide is highly degraded when stored at room temperature for an extended period (10 and 30 days), obtaining a low percent recovery (36%) with respect to the same condition for a short period (5 h) (88%). This suggests that light could be a relevant degradation factor for GK-1, probably by inducing deamidation, characterized by hydrolysis of asparagine to aspartate; this could be influenced by both extreme pH values and high temperatures [21,22]. However, a high percent recovery (99%) was obtained in the accelerated stability study of the lyophilized peptide subjected to controlled temperature and humidity conditions, indicating that the peptide in solution is less stable than lyophilized GK-1 when subjected to temperatures over 25 °C. It has long been known that incubating protein solutions at high temperatures results in physical degradation, such as aggregation. GK-1 stability in solution in contrast to the lyophilized form could be affected by aggregation, which has been found to depend strongly on the properties of the protein's solution environment, where relatively small changes of external variables (e.g., temperature, pH, salt type and concentration, etc.) in the protein–solvent system can destabilize the structure of the protein [6].

Long-term stability at freezer temperature (5 months) led to slight

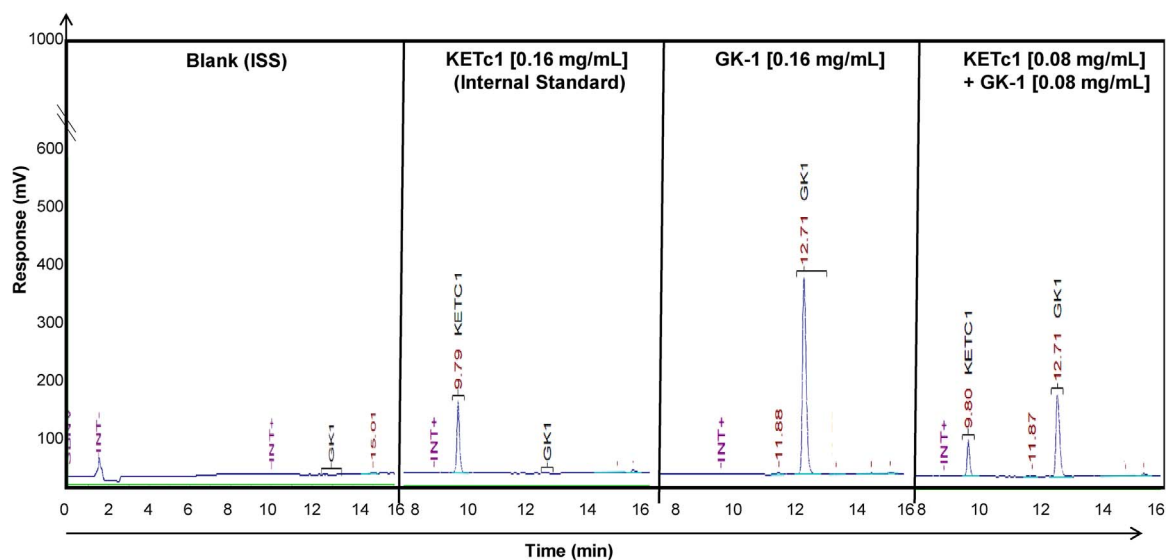


Fig. 1. Representative chromatogram of the method selectivity in samples containing either blank (ISS), the KETc1 internal standard, or the GK-1 peptide dissolved in ISS with a concentration of 0.16 mg/mL, or GK-1 in the presence of the internal standard with a concentration of 0.08 mg/mL each, detected at a wavelength of 220 nm.

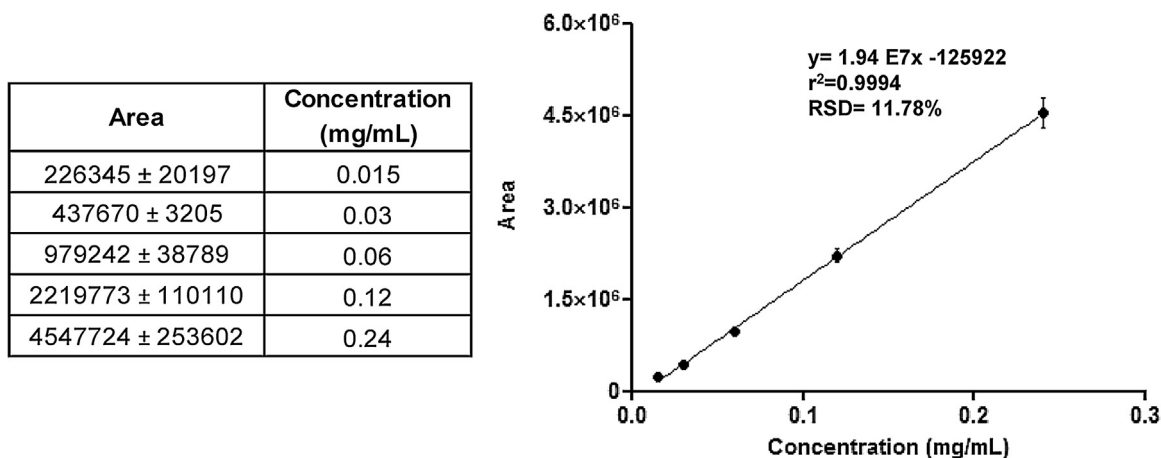


Fig. 2. Linearity of the analytical method for GK-1 identification in the concentration range 0.015–0.24 mg/mL. The calibration curve was constructed by plotting the analyte peak area ratio (y) versus the analyte nominal concentration (x). The linear regression equation for the calibration curve is shown.

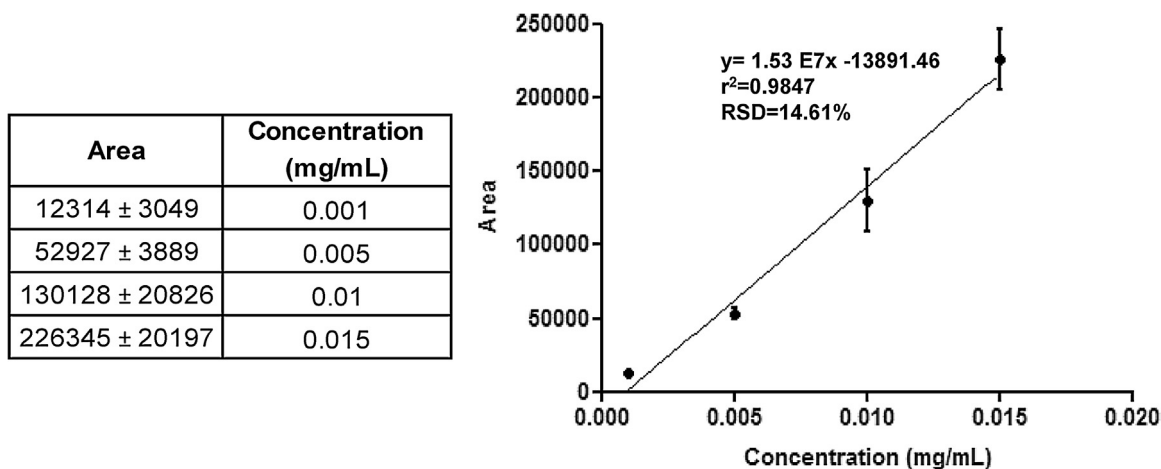


Fig. 3. Calibration curve to determine detection limit and quantification limit in the concentration range 0.001–0.015 mg/mL. Detection limit and quantification limit were assessed by comparison of blank against the blank enriched at different concentrations of the GK-1 peptide. The linear regression equation for the calibration curve is shown.

degradation, with an 85.8% recovery. However, the GK-1 peptide subjected to several freeze-thaw cycles is degraded in increased amounts as the number of cycles increases from 1 to 3, lowering percent recovery from 94.9% to 72.7%, respectively.

Other strategies may be useful to show that the analyte chromatographic peak is not attributable to more than one component, as the generation of electropherograms using a photodiode array detector (PDA) or a MALDI-TOF analysis. However, RP-HPLC has been used for

Table 1

Precision of the method in terms of repeatability.

Concentration (mg/mL)	Found intra-day concentration (mg/mL) Media \pm SD (n = 3)	Intra-run RSD (%)	Found inter-day concentration (mg/mL) Media \pm SD (n = 3)	Inter-run RSD (%)	Average% Recovery
0.025	0.028 \pm 0.00	0.55	0.026 \pm 0.001	1.9	107.7
0.08	0.082 \pm 0.001	1.29	0.084 \pm 0.003	0.4	104.1
0.16	0.157 \pm 0.003	2.22	0.165 \pm 0.017	1.03	100.3

Table 2Stability analysis of GK-1 peptide under different conditions. Aliquots (100 μ l) of GK-1 (1 mg/mL) in ISS were subjected to different treatments: pH, temperature and storage time, and diluted at a final concentration of 200 μ g/mL.

Stress condition	Peak area (mV) Media \pm SD	Found concentration (μ g/mL)	Average % recovery
pH stability			
2.16	3,246,218 \pm 93,005	166.7	83.3
3.75	3,404,980 \pm 163,213	174.6	87.3
7.2	4,010,793 \pm 347,839	204.4	102.2
8	3,438,336 \pm 647,637	176.3	88.1
Short-term stability			
4 °C	3,544,200 \pm 73,924	181.6	90.8
25 °C	3,440,993 \pm 159,800	176.4	88.2
40 °C	3,386,641 \pm 57,7701	173.7	86.8
Long-term stability			
RT, 10 days	1,346,598 \pm 11,575	72.1	36.1
RT, 30 days	1,513,576 \pm 43,937	72.3	36.1
Freezing, 5 months	3,346,167 \pm 104,010	171.1	85.8
Cycles of freeze–thaw stability			
1°	3,707,919 \pm 836,813	189.8	94.9
2°	3,011,390 \pm 73,924	155	77.5
3°	2,822,006 \pm 89,684	145.5	72.7
Accelerated stability	3,876,683 \pm 204,563	198.2	99.1

RT = room temperature. Calculations were performed for individual samples (n = 3) and analyzed after 5 h of exposure at each condition.

other authors for monitoring degradation in order to detect the presence of additional peaks associated with a concomitant decrease in the peak area of the intact molecule [22–24].

Overall, this work demonstrates the feasibility of the method for the analysis of the GK1 peptide's stability in various samples submitted to stressed conditions of pH, temperature and storage time conditions, and it should have important implications for the peptide processing and formulation strategies. As shown in Table 2, where deviation of the mean (%) responses was within \pm 15%, the GK-1 peptide was stable in the ranges of pH and temperature conditions usually employed in manufacturing drug processes.

Formulation strategies could be feasible to reduce deleterious chemical reactions, especially for the peptide prepared in solution and exposed to elevated temperature.

4. Conclusion

The GK-1 peptide is a synthetically produced molecule which has provided evidence of its immunomodulatory effect as a vaccine adjuvant or as a therapeutic agent against melanoma and breast cancer. Protein stability is a particularly relevant issue today in the pharmaceutical field, since it has been demonstrated that if a therapeutic protein cannot be stabilized adequately, its benefits will not be appropriately achieved [22].

This work has shown that GK-1 peptide is stable under different conditions of temperature, pH and storage time, using a RP-HPLC

method. The HPLC method was developed and validated as per ICH guideline [15]. The results proved that the method is suitable for the analysis of GK-1 peptide as bulk drug and provide necessary information for the adequate development of the drug product. It may be extended to study the stability of the peptide in pharmaceutical formulation and also for its estimation in plasma and other biological fluids.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA (IG-200414), CONACyT (253891), and Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. The authors acknowledge Martha E. Carrasco for her technical assistance to this work and Juan Francisco Rodriguez for English edition of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript draft.

References

- [1] A. Toledo, C. Larralde, G. Fragoso, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, M. Hernández, G. Acero, G. Rosas, F. López-Casillas, C. Kubli, R. Vázquez, I. Terrazas, E. Sciotto, Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis, *Infect. Immunity* 67 (1999) 2522–2530.
- [2] R. Segura-Velázquez, A. Perez-Torres, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, F. Rosetti, G. Fragoso, S. Grinstein, E. Sciotto, A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine, *Vaccine* 24 (2006) 1073–1080.
- [3] R. Segura-Velázquez, G. Fragoso, E. Sciotto, A. Sarukhan, Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1338–1343.
- [4] A. Pérez-Torres, J. Vera-Aguilera, J.C. Hernaiz-Leonardo, E. Moreno-Aguilera, D. Monteverde-Suarez, C. Vera-Aguilera, D. Estrada-Bárceñas, The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model, *Cancer Biother. Radiopharm.* 28 (2013) 682–690, <http://dx.doi.org/10.1089/cbr.2012.1438>.
- [5] G. Piñón-Zárate, M.Á. Herrera-Enríquez, B. Hernández-Téllez, K. Jarquín-Yáñez, A.E. Castell-Rodríguez, GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma, *J. Immunol. Res.* (2015) 176840, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/176840>.
- [6] E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1325–1336.
- [7] K.M. Al Azzam, B. Saad, C.Y. Tat, I. Mat, H.Y. Aboul-Enein, Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the analysis of sumatriptan succinate in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 937–943.
- [8] M. Miranda, D. Urioste, L.T. Andrade-Souza, A.A. Mendes, F.F. de Castro, Assessment of the morphological, biochemical, and kinetic properties for *Candida rugosa* lipase immobilized on hydrous Niobium Oxide to be used in the biodiesel synthesis, *Enzyme Res.* (2011) 216435, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/216435>.
- [9] Reviewer Guidance, Validation of chromatographic methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA, www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm134409.pdf (1994).
- [10] J.L. Meek, Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (1980) 1632–1636.
- [11] P. Jandera, Z. Kučerová, J. Urban, Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins, *J. Chromatogr. A*

- 1218 (2011) 8874–8889, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.064>.
- [12] V. Shamsurhin, O.V. Spicer, Defining intrinsic hydrophobicity of amino acids' side chains in random coil conformation. Reversed-phase liquid chromatography of designed synthetic peptides vs. random peptide data sets, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6348–6355, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.092>.
- [13] W.S. Hancock, *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Aminoacids, Peptides and Proteins*, CRC Press, U.S.A, 1984.
- [14] A. Toledo, G. Fragoso, G. Rosas, M. Hernández, G. Gevorkian, F. López-Casillas, B. Hernández, G. Acero, M. Huerta, C. Larralde, E. Sciotto, Two Epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1766–1773.
- [15] Guideline Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>.
- [16] U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> (2013).
- [17] U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Q1A(R2) Guideline Stability Testing of New Drug Substances and Products, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf> (2003).
- [18] D. Dey, S. Chaskar, N. Athavale, D. Chitre, Inhibition of LPS-induced TNF- α and NO production in mouse macrophage and inflammatory response in rat animal models by a novel Ayurvedic formulation, *BV-9238, Phytother. Res.* 28 (2014) 1479–1485.
- [19] W.S. Hancock, R.C. Chloupek, J.J. Kirkland, L.R. Snyder, Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of peptide and protein samples. Optimizing the separation of a growth hormone tryptic digest, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 31–43.
- [20] P. Dolashka, V. Moshtanska, V. Borisova, A. Dolashki, S. Stevanovic, T. Dimanov, W. Voelter, Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*, *Peptides* 32 (2011) 1477–1483.
- [21] K. Fu, A.M. Klibanov, R. Langer, Protein stability in controlled-release systems, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 24–25.
- [22] C.A. Kelly, S.M. Howdle, A. Naylor, G. Coxhill, L.C. Tye, L. Illum, A.L. Lewis, Stability of human growth hormone in supercritical carbon dioxide, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 56–67.
- [23] C.E. Kritsch, A. Berger, C. Heinrich-Cseh, A. Bugajska-Schretter, W. Zauner, Separation and quantification of a novel two-component vaccine adjuvant, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 263–270.
- [24] E.R. Proos, J.H. Prescott, M.A. Staples, Long-term stability and in vitro release of hPTH (1–34) from a multi-reservoir array, *Pharm. Res.* 25 (2008) 1387–1395.



Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity

Jacquelynne Cervantes-Torres, Isabel Gracia-Mora, René Segura-Velazquez, Regina Montero-Montoya, Javier Espinosa-Aguirre, María E. Gonsebatt, Rafael Camacho-Carranza, Marisol Rivera-Huerta, Francisco Sanchez-Bartez, Mabel Tinoco-Méndez, Patricia Ostrosky-Wegman, Gladis Fragoso & Edda Sciutto

To cite this article: Jacquelynne Cervantes-Torres, Isabel Gracia-Mora, René Segura-Velazquez, Regina Montero-Montoya, Javier Espinosa-Aguirre, María E. Gonsebatt, Rafael Camacho-Carranza, Marisol Rivera-Huerta, Francisco Sanchez-Bartez, Mabel Tinoco-Méndez, Patricia Ostrosky-Wegman, Gladis Fragoso & Edda Sciutto (2019): Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, DOI: [10.1080/08923973.2019.1566359](https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1566359)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1566359>



Published online: 04 Feb 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 66



View Crossmark data [↗](#)

Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity

Jacquelyne Cervantes-Torres^{a*}, Isabel Gracia-Mora^{b*}, René Segura-Velazquez^c, Regina Montero-Montoya^a, Javier Espinosa-Aguirre^a, María E. Gonsebatt^a, Rafael Camacho-Carranza^{a,d}, Marisol Rivera-Huerta^b, Francisco Sanchez-Bartez^b, Mabel Tinoco-Méndez^b, Patricia Ostrosky-Wegman^a, Gladis Fragoso^a and Edda Scitutto^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico; ^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico; ^cUnidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México, Mexico; ^dFacultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

ABSTRACT

Context: Influenza is a severe, life-threatening viral disease that can be prevented by vaccination. However, the anti-influenza human vaccine failed to show the required efficacy both in infants under 5 years old and in the elder population, who are among those with the highest risk of developing severe complications after influenza infection. Therefore, it is of high importance to improve the vaccine efficacy and ensure its safety in these susceptible populations.

GK-1, a novel 18-aa peptide adjuvant, has been proved to increase the immunogenicity of the human influenza vaccine in both young and aged mice.

Objective: A preclinical study of the toxicity profile of GK-1 following the World Health Organization guidelines to support its use was herein conducted.

Material and methods: GK-1 was synthetically produced following Good Manufacturing Practices. The toxicological evaluation of GK-1 peptide was performed in rats after repeated dose-ranging trials by the subcutaneous route. The mutagenic potential of GK-1 was assessed by the micronucleus, chromosomal aberration, and Ames tests, in accordance with OECD Guidelines.

Results: GK-1 did not show toxic effects at doses up to 12.5mg/kg, corresponding to 25 times the dose intended for human use. No indications of mutagenic potential were observed. GK-1 after dermal administration was well tolerated locally.

Conclusion: The efficacy of GK-1 to improve influenza vaccine protection, along with the absence of toxicity and mutagenicity, as reported herein, support the evaluation of this peptide in a clinical trial as a novel adjuvant for human use.

ARTICLE HISTORY

Received 26 September 2018
Revised 2 December 2018
Accepted 30 December 2018

KEYWORDS

GK-1 peptide; toxicity; genotoxicity; mutagenicity; adjuvant

Introduction

Recent progress in immunology has led to the development of a broad range of novel vaccines to prevent infectious diseases [1]. In addition, improvements to already licensed vaccines are being considered, resulting in the marketing of new products and the introduction of a new generation of adjuvants [2].

However, despite the huge efforts and resources invested in developing effective vaccines, the efficacy of some vaccines remains undesirably low. Such is the case of influenza vaccine, whose failures in conferring protection to vaccinated subjects have resulted in increased rates of hospitalization and mortality in the population especially vulnerable to influenza-associated complications (<2 and >60 years old) [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225143/AE_influenza_100216.pdf].

GK-1, an 18-amino acid peptide first identified in *Taenia crassiceps* cysticerci, is capable of adjuvating the influenza

vaccine in elder mice [3] by enhancing the activation state of cells taking part in antigen presentation (macrophages and dendritic cells) [4] and also favoring T cell activation [4–6]. It has been recently reported that the GK-1 peptide has antitumoral properties against murine melanoma and breast cancer [7,8]. While these evidences show the potential of GK-1 as an immunomodulator, its possible use in humans requires security studies.

According to the WHO, nonclinical studies on vaccines are aimed to define their safety and immunogenicity. Toxicity studies should address the possible risks associated with its application and aid to plan clinical trial protocols [9]. Since several toxic effects have been reported as associated with vaccine components like adjuvants or preservatives, toxicity and, genotoxicity studies are mandatory. When no toxicological data are available for adjuvants, toxicity studies of the adjuvant alone should be performed first, as required for

new chemical entities [10,11]. The objective of the toxicological evaluation is to identify a dose level, such as a no-observed-adverse-effect-level (NOAEL), that can guide the start of clinical dosing after considering relevant biological or physiological parameters (e.g. body weight, food consumption, clinical pathology, necropsy, and histopathology) [9]. Additionally, a study on single or repeated dose toxicity may include the assessment of local tolerance for the route of administration intended for human use. Genotoxicity studies include the evaluation *in vitro* of mutations and chromosomal damage prior to the first human exposure [12].

A preclinical safety study of the GK-1 peptide is herein reported. A repeat-dose study was conducted in rats and the delayed-type hypersensitivity test was performed on guinea pigs. The *in vivo* micronucleus test was conducted in rats, and *in vitro* tests were performed to measure potential gene mutations and chromosomal damage induced by GK-1.

Material and methods

The studies were conducted at a certified preclinical research center (UNIPREC, UNAM) by the Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) in compliance with the Good Laboratory Practices.

GK-1

The GK-1 peptide (GYYPSPDNTFYAPPYSA) was synthesized under GMP (98% purity) by USV, LTD, Mumbai, India (batch RD0001). The peptide was solubilized in 0.9% saline solution (ISS) at the concentration required for each test. This solution was demonstrated to be stable under different stress conditions [13].

Subchronic toxicity studies

Animals

A total of 40 male and 40 female HsdHan: WIST rats S.P.F. (Specific Pathogen-Free), 6–8 weeks of age were employed for subchronic studies. For the pyrogenicity test, three male New Zealand white rabbits with a mean body weight (BW) of 1.6 kg were employed. For the hypersensitivity test, 22 male and 8 female Hartley guinea pigs (average weight 300 g) were used. All animals were kept in the Animal Facilities of the Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) at the Chemistry Faculty, UNAM, in racks with food and water *ad libitum*. Room temperature was maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative humidity was 40–70% with a 12/12 h light/dark cycle.

All procedures, maintenance, handling, and euthanasia of animals were performed in accordance with all applicable international (NIH Publications No. 8023), national (NOM-062-ZOO-1999), and institutional guidelines for animal care and use. The Institutional Animal Ethics Committee approved all the experimental procedures.

Repeated-dose toxicity

The studies were performed after repeated GK-1 dose-ranging trials by the subcutaneous route. The animals were randomly assigned to four groups: G1 (0.5 mg/kg BW), G2 (5 mg/kg BW), G3 (12.5 mg/kg BW), and G4 (vehicle control) with repeated doses at 1, 7, 14, and 21 days. Ten males and 10 females were included in each group.

The rats were weighed before treatment and once a week after treatment. Blood samples were collected before and 1, 24, and 69 days after the last injection, for hematological and chemical tests. Hematological and chemical parameters were determined by the KONTRONLAB BCVet device (DESEGO) and the automated chemistry analyzer CST-240 (DIRUI), respectively. A complete necropsy study was performed on 5 male and 5 female rats from each group at days 46–47 and 91. Tissue samples (brain, spleen, liver, kidney, adrenal gland, heart, skin, lymph nodes, and spinal cord) were collected and placed in 10% buffered formalin, included in paraffin and processed to obtain 3- μm slices. Slices were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined by a veterinary pathologist.

Additionally, urine samples were collected at days 0, 22, 45, and 90 by using stainless steel metabolic cages for a pickup period of 4–6 h. Physical parameters like appearance, color, odor, and density were measured. pH, proteins, glucose, ketone bodies, bilirubin, urobilinogen, and blood/hemoglobin were determined with the urine test strips/IDEXX VetLab UA device (IDEXX Laboratories, Inc). A microscopic examination was also performed.

Statistical analysis

Similarity among variables or individuals was tested using the Spearman or Person correlation with a 95% of confidence. Differences in body weight between treated groups were evaluated by one-way ANOVA with a significance determined by the t-Holm-Sidak *post-hoc* test. A two-way ANOVA was used to evaluate possible differences between variables under study (day, concentration, weight). Data on hematology, biochemistry, and urine analysis were analyzed between the control and study groups by one- or two-way ANOVA. Differences were considered as statistically significant at $p < .05$. A *t*-test was employed to compare 1:1 independent variables.

Delayed dermal sensitization test

To evaluate the sensitizing potential of the GK-1 peptide when dermally applied (dorsal region), a hypersensitivity test was conducted according to the Buehler method [14]. Groups of 10 or 20 guinea pigs were administered in duplicate with either ISS (0.5 ml) or the GK-1 peptide (2.5 mg in 0.5 ml per animal) for three consecutive days for three weeks. Fifteen days later, the animals were topically challenged, and the treated sites of each animal were examined and scored for erythema and edema [15] 24 and 48 h after patch removal. A score of 1 or greater for redness is considered as a positive reaction. Sensitization potential is

determined based on the percentage of animals showing a positive response.

Pyrogenicity test

GK-1 was solubilized in ISS and administered in a volume of ~3 ml/kg (0.5 mg GK-1/kg BW) in an ear vein of New Zealand rabbits. The rectal temperature of each rabbit was measured twice 30 min prior to GK-1 injection to determine control temperature and recorded at 30 min intervals for 3 h after injection. A product fulfills the requirements for absence of pyrogens if no rabbit shows an individual rise in temperature of 0.5 °C or more above its respective control [16,17].

Genotoxicity tests

Bacterial reverse mutation assay (Ames test)

The assay was carried out by the preincubation method according to the OECD 471 Guideline [18]. The reverse mutation test used herein employed the histidine-dependent *Salmonella typhimurium* strains, TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537 to detect point mutations. The GK-1 peptide was tested at levels of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 5.0 mg per plate, previously dissolved in phosphate buffer (pH = 7.4) and 1% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Briefly, bacterial cultures containing ~10⁸ viable cells were preincubated at 37 °C for 20 min with the GK-1 peptide, either in the presence or absence of 0.5 ml of the metabolic activation fraction S9 from liver cells of rats treated with NADP and glucose-6-phosphate. The treatment mixture was mixed with the overlay agar and poured onto the surface of Vogel-Bonner minimal agar plate. The plates were incubated for 72 h at 37 °C, and the number of revertant colonies was assessed. Triplicate plates were used at each dose level. Negative (spontaneous revertant colonies) and appropriate positive controls were included. A substance is mutagenic, if (1) there is a two-fold increase in the number of spontaneous revertant colonies in at least one strain and, (2) the increase is related to the concentration over the range tested.

In vivo micronucleus test

The micronucleus test was performed following the OECD TG 474 guideline [19]. Briefly, six-week-old male Wistar rats, five animals per experimental group, were treated with three doses of the peptide. In addition, one group was treated with ISS (negative control) and another with a genotoxic agent (cyclophosphamide, positive control). The rats were treated orally for two consecutive days and sacrificed on the third day. The peptide was administered at a dose of 0.5, 2.5, or 12.5 mg/kg BW; cyclophosphamide was administered at a dose of 10 mg/kg BW. On the day of sacrifice, blood was collected by cardiac puncture. The blood was diluted in a BBS-heparin 1:1 solution and placed in methanol-ultra frozen at -70 °C. The samples were stored at -70 °C until analyzed. All samples were processed according to the method developed by Weaver and Torous [20] and Dertinger et al. [21] and following the MicroFlow method manual [22]. Anti-CD71 and anti-CD61 antibodies were used to identify reticulocytes

and platelets, respectively, and propidium iodide was used to stain the DNA from nucleated and micronucleated cells. Cell acquisition and analysis were performed using an Attune Blue/Violet flow cytometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) at the National Cytometry Laboratory of the Biomedical Research Institute. Micronucleus analysis was conducted in a population of erythrocytes and reticulocytes after selecting nucleated cells and platelets, starting from a population of 250,000 cells for each triplicate.

The proportion of reticulocytes (immature erythrocytes), the percent frequency of micronuclei in reticulocytes, and the percent frequency of micronuclei in mature erythrocytes were determined. The results were compared against positive and negative controls to establish whether there was a genotoxic effect. Three determinations per animal from each group were carried out, except for one animal from each group, which was assessed only twice.

Micronucleus frequencies were analyzed by using the Kruskal-Wallis non-parametric test, and reticulocyte percental rates were analyzed by ANOVA with a Scheffe test table. Significance was established at 0.05.

In vitro mammalian chromosomal aberration test

The chromosomal aberrations test was performed following the OECD 473 guideline for the testing of chemicals [23]. Heparinized blood samples were obtained from a young (18–34 years old) healthy donor. Duplicate human whole blood cultures were treated with different concentrations of GK-1, with and without metabolic activation. For studies with no metabolic activation, a set of continued cultures were started with 0.5 ml of whole heparinized blood in 5.5 ml of RPMI 1640 culture medium (Microlab, Mexico) supplemented with 0.01 ml of L-glutamine and non-essential amino acids (Gibco, Gaithersburg, MD) and 0.2 ml of PHA (Gibco); after 24 h of culture, GK-1 was added to different final concentrations (0.001, 0.01, or 0.1 mM). Fifty microliters of Colcemid (Gibco) were added 2 h before harvesting, at 72 h of culture. To test whether GK-1 activity was modified by metabolic activation, whole blood cultures were prepared as described above and treated for 2 h with the S9 fraction and 50 µL of GK-1 at the concentrations described. The S9 fraction and GK-1 were removed by centrifugation and the cells were washed with fresh culture medium. Cell cultures were added with 50 µL of Colcemid (Gibco) until harvesting at 72 h, as described above. To determine whether cell manipulation could affect the proliferative capacity of lymphocytes, a duplicate set of cell cultures was processed in a similar manner, but with no metabolic activation. Negative control cultures were added with 50 µL of culture medium; positive controls were added either with cisplatin (0.16 mM) when no metabolic activation was induced, or cyclophosphamide (6 µM) when cells were metabolically activated.

For chromosome preparations, cells were centrifuged at ~200 × g for 10 min. Culture medium was removed and 5 ml of prewarmed (37 °C) KCl hypotonic solution, 0.07 M was added. Cells were resuspended in culture tubes and incubated in a water bath at 37 °C for 20 min. After incubation, the cell suspension was centrifuged again for 10 min.

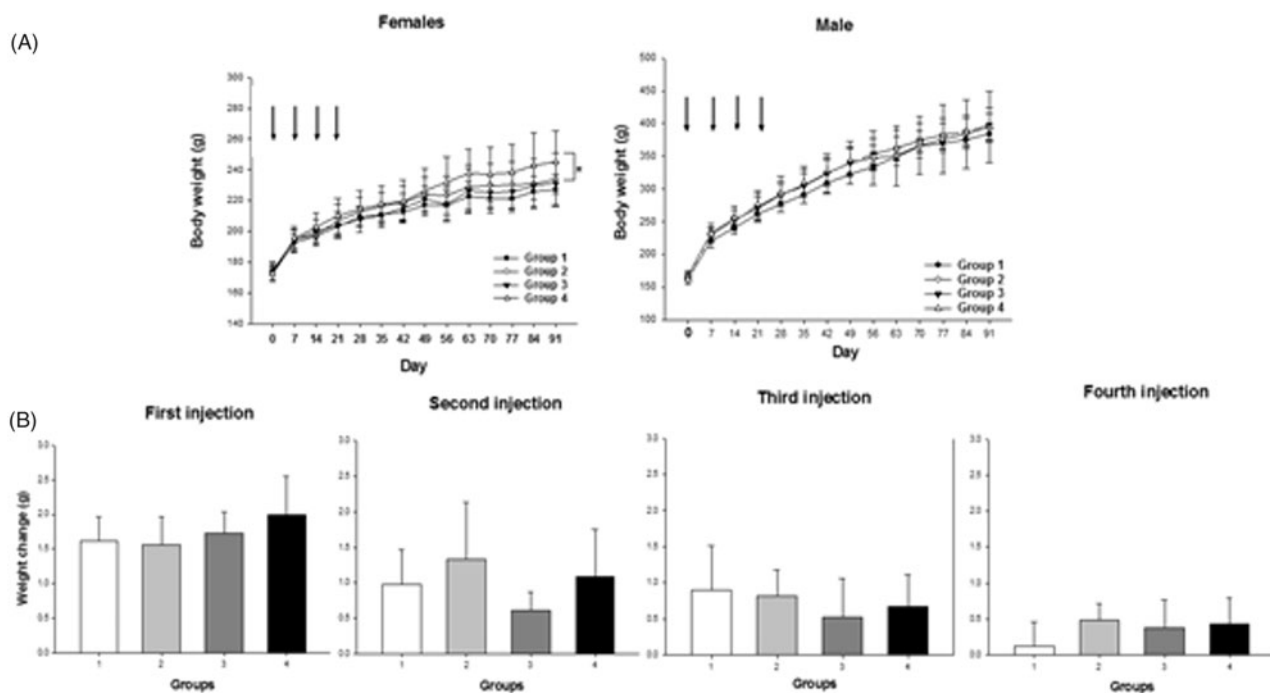


Figure 1. Effect of GK-1 on body weight (BW) of rats for a 90-day repeated-dose toxicity study. Rats were distributed into four groups with 10 rats of both sexes. Each group was immunized at days 1, 7, 14, and 21 with 0.5 mg/kg BW (group 1), 5 mg/kg BW (group 2), and 12.5 mg/kg BW (group 3). Control group 4 received only the vehicle. (A) Arrows indicate the time of injections. Data indicate weekly mean \pm SE BW of 10 rats for the eight points and five rats for the last seven points; * $p < .05$ Group 1 vs. Group 4. (B) Bars indicate the mean \pm SE change in body weight of female rats after first, second, third, and fourth injection.

Supernatants were discarded and 5 ml of fixative solution (methanol-glacial acetic acid 3:1) was added. Fixative solution was removed by centrifugation and changed two times more. Cells were kept at 4°C overnight. Slides for chromosomal aberration analysis were prepared by placing five drops of the fixed cell suspension on clean glass slides and flame-drying. Microscopic preparations were stained with Giemsa stain (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The presence of chromosomal aberrations was determined for each culture in 100 consecutive well-spread metaphases with 46–45 centromeres. Aberration types were classified as chromatid gaps (gap: achromatic lesion with a width less than that of a chromatid), isochromatid gaps, chromatid and isochromatid deletions, chromatid exchanges (triradials, quadriradials), and chromosomal exchanges (dicentrics, rings, and translocations).

Results

Sub-chronic toxicity studies

Clinical observations

No deaths or apparent clinical signs were found in any group throughout the study period. No statistically significant treatment-related differences in mean BW were found in male nor female rats from any treatment group compared to controls in the study period; however, a small (<6%) significant weight loss was observed in female rats treated with the GK-1 peptide at a dose of 0.5 mg/kg and only at the day 90 of the study (Figure 1). Weight-gain rates in all other GK-1-treated rats were similar to those in saline-treated controls.

The GK-1 preparation was well tolerated after dermal administration in guinea pigs, with no (score of 0) erythema

nor swelling (Supplementary Table 1). In addition, no evidences of febrile reaction induced by the i.v. injection of the GK-1 peptide were observed (Supplementary Figure 1).

Hematology, clinical chemistry, and urinalysis

A slight but significant decrease in hematocrit and hemoglobin concentration was observed in female rats receiving GK-1 at 0.5 mg/kg (Table 1). No differences in red blood cell parameters were found among male rats in any experimental group (Table 2). Leukocyte counts (lymphocytes, eosinophils, monocytes, basophils) were not significantly different in female and male rats throughout the 90-day subchronic study (Tables 1 and 2). Neutrophil counts in blood samples were slightly increased in groups 2 (5 mg GK-1/kg BW) and 3 (12.5 mg GK-1/kg BW) of female rats and in group 3 of male rats, with respect to group 4 (control). However, this increase was no longer apparent in blood samples collected 1 day after the last injection (Supplementary Figure 2).

None of the serum biochemical parameters related to liver and kidney function showed significant differences in female rats treated with any GK-1 concentration with respect to control rats (Table 3). However, increased alanine aminotransferase (ALT) and glucose levels were observed in male rats treated with GK-1 at a dose of 0.5 mg/kg (Table 4). Urinalysis showed no significant differences in female and male rats at any GK-1 concentration (Tables 5 and 6, respectively).

Histological examination

No abnormal traits or lesions were observed in any organ examined from GK-1 treated rats. Histological analysis revealed no treatment-related changes. Some congestion

Table 1. Effect of the synthetic GK-1 peptide on hematological parameters during a 90-day repeated dose toxicity study (female rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Hb (g/L)	139.6 ± 5 ^a	145.6 ± 4	144.2 ± 3	147 ± 2.6
HT (L/L)	0.44 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.47 ± 0.01
MCV (μm ³)	56.0 ± 2.0	56.8 ± 2.6	56.2 ± 1.5	56.8 ± 1.9
MCHC (g/L)	312.0 ± 4.5	310.2 ± 3.7	310.2 ± 2.9	309.6 ± 2.6
Erythrocytes (×10 ¹² /L)	7.96 ± 0.5	8.24 ± 0.4	8.28 ± 0.2	8.32 ± 0.2
Platelets (×10 ⁹ /L)	740.0 ± 117.7	874.6 ± 31.3	806.8 ± 36.3	974.6 ± 58.3
Leucocytes (×10 ⁹ /L)	4.52 ± 1.9	4.88 ± 1.2	4.260 ± 0.7	3.78 ± 1.3
Differential leucocyte count				
Neu (×10 ⁹ /L)	0.22 ± 0.08	0.44 ± 0.2 ^a	0.50 ± 0.25 ^a	0.18 ± 0.04
Lym (×10 ⁹ /L)	4.26 ± 1.8	4.38 ± 1.2	3.64 ± 0.7	3.54 ± 1.32
Eos (×10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.08 ± 0.08	0.04 ± 0.05
Mon (×10 ⁹ /L)	0.04 ± 0.5	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.5	0.02 ± 0.04
Bas (×10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0

Data are reported as mean ± standard deviation. Data were analyzed by unpaired *t*-test, ^a*p* < .05 vs. CTR group.

Hb: hemoglobin; HT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; Neu: neutrophils; Lym: lymphocytes; Eos: eosinophils; Mon: monocytes; Bas: basophils. CTR = control; and GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

Table 2. Effect of the synthetic GK-1 peptide on hematological parameters during a 90-day repeated dose toxicity study (male rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Hb (g/L)	148.6 ± 7.2	151.8 ± 7.9	150.6 ± 5	150.8 ± 2.5
HT (L/L)	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.01
MCV (μm ³)	53.8 ± 1.9	53.2 ± 1.8	53.4 ± 0.5	53.2 ± 0.8
MCHC (g/L)	313.6 ± 4.6	315.6 ± 2.1	312.2 ± 5.6	314.4 ± 5.2
Erythrocytes (×10 ¹² /L)	8.80 ± 0.5	9.04 ± 0.5	9.04 ± 0.4	9.00 ± 0.4
Platelets (×10 ⁹ /L)	531.4 ± 82.2	674.0 ± 306.3	836.2 ± 160.9	835.8 ± 179.2
Leucocytes (×10 ⁹ /L)	5.64 ± 1.3	6.52 ± 0.7	5.72 ± 1.2	5.68 ± 1.8
Differential leucocyte count				
Neu (×10 ⁹ /L)	0.40 ± 0.4	0.460 ± 0.2	0.84 ± 0.8	0.44 ± 0.2
Lym (×10 ⁹ /L)	5.22 ± 1.2	5.00 ± 1.9	4.84 ± 0.7	5.20 ± 1.7
Eos (×10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.05
Mon (×10 ⁹ /L)	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04
Bas (×10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0

Data are reported as mean ± standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA, n.s. for all parameters.

Hb: hemoglobin; HT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; Neu: neutrophils; Lym: lymphocytes; Eos: eosinophils; Mon: monocytes; Bas: basophils. CTR = control; GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

and cellular degeneration non-related with the GK-1 treatment were observed in some samples due to agonic lesions (Figure 2).

Genotoxicity tests

Bacterial reverse mutation assay (Ames test)

The GK-1 peptide was tested up to a concentration of 5 mg per plate both in the presence and absence of the S9 fraction. No statistically significant increases in the number of revertant colonies nor a decrease in their number due to toxicity were observed for any of the five bacterial strains used in any of the concentrations tested. All positive control compounds caused a significant increase in the number of revertant colonies (Table 7).

In vivo micronucleus test

As shown in Table 8 and Supplementary Figure 3(A), GK-1 had no genotoxic effect on peripheral blood reticulocytes in none of the three doses tested. Also, no significant effect was observed on circulating mature normocytes or erythrocytes. With respect to the proportion of reticulocytes (Supplementary Figure 3(B)); GK-1 treatment at a dose of the 12.5 mg/kg BW led to a significant increase with respect to negative controls (*p* = .0001). Cyclophosphamide, on the contrary, significantly reduced the proportion of circulating reticulocytes.

Chromosomal aberration test

The peptide GK-1 failed to show clastogenic activity on human lymphocytes *in vitro*. As shown in Table 9, no significant increase in the proportion of cells showing chromosomal aberrations was observed at any concentration of GK-1. In contrast, positive controls showed a significant increase in the percentage of aberrations with respect to the control group (0 mM).

Discussion

GK-1 is an 18-aa peptide with proved adjuvant properties for the influenza vaccine in mice [3,4] and antitumoral effects in a murine model of melanoma and breast cancer [7,24,25]. Considering these relevant properties, it is imperative to evaluate its safety before conducting clinical assays. In this work, preclinical studies were conducted on GK-1, intending to use it as an adjuvant.

The preclinical tests performed were selected in accordance to the WHO 'Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, 2013' and the Annex 1 'WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, 2005,' that specify the tests required to assess new adjuvants. According to those documents, it could be important to conduct some studies with the adjuvant alone (like systemic toxicity and genotoxicity) before clinical assays in humans. When necessary, studies on developmental toxicology should be conducted before any clinical trial on pregnant women, i.e. for those vaccines specifically developed to be applied during pregnancy [9].

Selecting appropriate tests, route of administration, and dose regimens can help us to estimate potential adverse effects that might occur during clinical trials [26]. GK-1 was subjected to subchronic studies, which can reveal cumulative effects on target organs after long-term exposure and help us determine appropriate dose regimens [27,28]. Additionally, a repeated-dose toxicity trial is usually requested for vaccines and adjuvants when multiple doses are required in clinical use; furthermore, this could be advisable even in cases where only single doses are administered [29,30]. Therefore, repeated doses were tested for GK-1.

When evaluating the GK-1 peptide safety, data on its effective dose as an adjuvant [3,4] provided initial information to select dose levels for the toxicity study. A subchronic study on the peptide (90-day repeated dose) was conducted

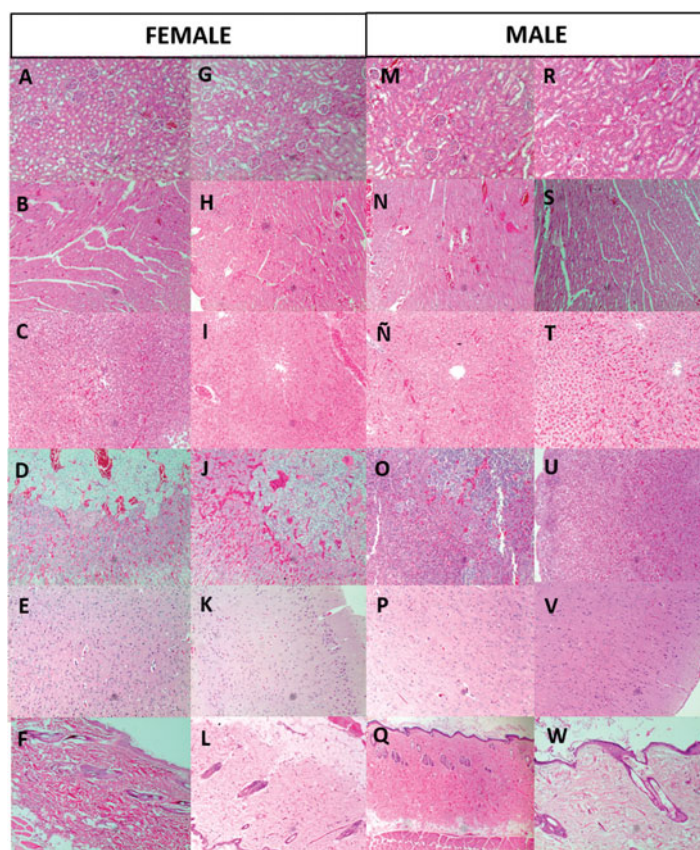


Figure 2. Effects of GK-1 peptide on histological findings of kidney (A, G, M, R), heart (B, H, N, S), liver (C, I, Ñ, T), adrenal gland (D, J, O, U), brain (E, K, P, V), and skin (F, L, Q, W) in rats during a 90-day repeated-dose toxicity study. Photomicrographs from representative rats in the respective groups: Control female (A–F) and male (M–Q) group, and GK-1 at 12.5 mg/kg BW in female (G–L) and male (R–W) groups. H&E stain 10 \times .

Table 3. Effect of the synthetic GK-1 peptide on blood chemistry during a 90-day repeated dose toxicity study (female rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Liver function tests				
ALT (IU/L)	73.0 \pm 16.1	71.2 \pm 17.1	73.4 \pm 16.1	70.4 \pm 19.6
AST (IU/L)	132.4 \pm 41.2	91.6 \pm 15.4	102.8 \pm 18.5	104.0 \pm 10.1
ALP (IU/L)	106.6 \pm 40.9	94.6 \pm 45.3	93.4 \pm 53.9	75.0 \pm 18.0
BTB (μ mol/L)	2.78 \pm 1.1	2.36 \pm 0.3	2.18 \pm 0.5	2.64 \pm 0.7
Total protein (g/L)	68.4 \pm 2.3	71.6 \pm 4.9	71.2 \pm 4.9	72.0 \pm 3.9
Albumin (g/L)	41.0 \pm 2.5	43.0 \pm 5.6	41.2 \pm 3.1	41.8 \pm 2.6
Kidney function tests				
Creatinine (μ mol/L)	61.6 \pm 6.3	56.4 \pm 2.5	56.8 \pm 2.2	54.0 \pm 3.5
Urea (mmol/L)	8.80 \pm 1.1	8.10 \pm 0.6	8.26 \pm 0.6	7.88 \pm 0.5
Metabolic function tests				
Glucose (mmol/L)	9.70 \pm 1.2	9.48 \pm 0.7	8.62 \pm 0.3	8.66 \pm 0.6
Cholesterol (mmol/L)	2.38 \pm 0.4	2.60 \pm 0.7	2.22 \pm 0.3	1.95 \pm 0.4

Data were reported as mean \pm standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA, n.s. for all parameters.

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; BTB: total blood bilirubin. CTR = control; GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

in rats. BW changes have been used as an indicator of drug adverse effects [31]. Significant changes ($p < .05$) in BW at the end of the study were observed in the group administered with the lowest GK-1 dose (Group 1) with respect to the control group (Group 4) in female rats. However, a proportional increase in BW as a function of time was observed in all groups, not showing significant changes in net weight gain (final-initial) per group. Considering this, it can be concluded that GK-1 administration has no effect on the growth of rats.

Table 4. Effect of the synthetic GK-1 peptide on blood chemistry during a 90-day repeated dose toxicity study (male rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Liver function tests				
ALT (IU/L)	92.0 \pm 17.6 ^a	76.6 \pm 9.3	74.0 \pm 9.3	67.4 \pm 10.7
AST (IU/L)	139.2 \pm 41.2	112.0 \pm 21.9	119.6 \pm 24.3	120.2 \pm 28.2
ALP (IU/L)	206.0 \pm 57.3	189.8 \pm 59.8	174.8 \pm 34.3	178.4 \pm 22.4
BTB (μ mol/L)	2.54 \pm 0.2	2.50 \pm 0.5	2.52 \pm 0.7	2.72 \pm 0.7
Total protein (g/L)	69.2 \pm 1.9	70.0 \pm 3.1	70.6 \pm 3.0	69.2 \pm 0.2
Albumin (g/L)	38.6 \pm 0.9	38.2 \pm 1.5	38.6 \pm 1.1	38.0 \pm 1.6
Kidney function tests				
Creatinine (μ mol/L)	52.2 \pm 3.6	48.6 \pm 3.1	51.0 \pm 3.3	41.6 \pm 3.5
Urea (mmol/L)	7.30 \pm 0.6	7.36 \pm 0.8	7.00 \pm 0.5	6.62 \pm 0.5
Metabolic function tests				
Glucose (mmol/L)	10.00 \pm 1.4 ^b	7.26 \pm 0.8	7.72 \pm 0.8	7.12 \pm 0.9
Cholesterol (mmol/L)	2.42 \pm 0.4	2.52 \pm 0.7	2.37 \pm 0.2	2.55 \pm 0.2

Data were reported as mean \pm standard deviation. Data were analyzed by unpaired t -test, ^a $p < .05$ vs. CTR ^b $p < .05$ vs. CTR group; GK1-5.0 and GK1-12.5 group.

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; BTB: total blood bilirubin. CTR = control; GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

The evaluation of hematological parameters can be used to assess drug toxicity, since changes in the hematopoietic system have shown a high predictive value in humans and animals [9,28]. A decrease in female Hb and TH values was observed in Group 1 (GK-1 at 0.5 mg/kg BW) with respect to the control group; these alterations were not relevant, since the mean values for both parameters are within reference intervals for rats [32]. These differences were found to be

Table 5. Effect of the synthetic GK-1 peptide on urine tests during a 90-day repeated dose toxicity study (female rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Color	Yellow to light yellow	Yellow to light yellow	Yellow to light yellow	Yellow to light yellow
Density (g/cm ³)	1.010 ± 0.005	1.009 ± 0.002	1.007 ± 0.002	1.010 ± 0.003
pH	8.200 ± 0.447	8.000 ± 0.000	7.800 ± 0.447	8.200 ± 0.837
Protein (g/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Glucose (mmol/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Ketones (mmol/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Bilirubin (μg/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Blood/Erit Hem/L	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Erythrocytes /400×	0.000	0-1	0.000	0.000
Leukocytes /400×	0-1	0.000	0.000	0-1
Bacteria	Absence	Absence	Absence	Absence

Data were reported as mean ± standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA, n.s. for all parameters. CTR = control; GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

Table 6. Effect of the synthetic GK-1 peptide on urine assay during a 90-day repeated dose toxicity study (male rats).

Parameters	G1 GK1-0.5	G2 GK1-5.0	G3 GK1-12.5	G4 CTR
Color	Yellow to light yellow	Yellow	Yellow to light yellow	Yellow to light yellow
Density (g/cm ³)	1.008 ± 0.003	1.010 ± 0.001	1.008 ± 0.002	1.010 ± 0.005
pH	8.200 ± 0.447	8.400 ± 0.548	8.000 ± 0.000	8.400 ± 0.548
Protein (g/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Glucose (mmol/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Ketones (mmol/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Bilirubin (μg/L)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Blood/Erit Hem/L	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Erythrocytes /400×	0.000	0-1	0.000	0-1
Leukocytes /400×	0-1	0-1	0-1	0-1
Bacteria	Absence	Absence	Absence	Absence

Data were reported as mean ± standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA, n.s. for all parameters. CTR = control; GK-1 treatment at 0.5; 5.0 and 12.5 mg/kg BW.

Table 7. Effect of the GK-1 peptide on *Salmonella typhimurium*.

Concentration (mg per plate)	S-9 mix	Number of revertant colonies per plate				
		TA1535	TA100	TA102	TA98	TA1537
0 ^a	+	13 ± 2	122 ± 12	482 ± 28	36 ± 5	35 ± 3
0.125	+	15 ± 2	136 ± 9	462 ± 10	31 ± 6	34 ± 5
0.25	+	10 ± 3	122 ± 10	461 ± 23	30 ± 3	35 ± 5
0.5	+	19 ± 4	122 ± 5	468 ± 22	33 ± 7	39 ± 8
1.0	+	12 ± 3	127 ± 19	464 ± 22	30 ± 8	34 ± 10
5.0	+	19 ± 5	125 ± 23	439 ± 48	26 ± 1	35 ± 7
Positive control	+	384 ± 36 ^c	2923 ± 466 ^e	2227 ± 141 ^g	498 ± 12	102 ± 11
0 ^a	-	17 ± 3	131 ± 7	411 ± 49	19 ± 7	21 ± 1
0.125	-	18 ± 3	109 ± 3	361 ± 13	24 ± 6	19 ± 1
0.25	-	19 ± 4	121 ± 5	371 ± 15	17 ± 1	21 ± 7
0.5	-	16 ± 3	129 ± 6	325 ± 11	19 ± 2	16 ± 2
1.0	-	19 ± 3	117 ± 12	354 ± 34	18 ± 5	24 ± 12
5.0	-	17 ± 5	117 ± 7	348 ± 20	16 ± 5	25 ± 3
Positive control	-	1319 ± 8 ^b	1083 ± 67 ^d	1437 ± 121 ^f	457 ± 43	84 ± 15

Data were reported as the mean number of revertant colonies per plate ± standard deviation.

^aSpontaneous revertant colonies; ^bsodium azide 1 μg/plate; ^c2-aminoanthracene 2 μg/plate; ^dpricolonic acid 100 μg/plate; ^ebenzo[a]pyrene 10 μg/plate; ^f4-nitroquinoline-N-oxide 1 μg/plate; ^g2-aminoanthracene 5 μg/plate.

Table 8. Micronuclei frequency in reticulocytes and mature erythrocytes.

Treatment	% MN in reticulocytes	% MN in mature erythrocytes
Vehicle (saline solution)	0.37 ± 0.12	0.20 ± 0.05
GK-1; 0.5 mg/kg BW	0.34 ± 0.05	0.16 ± 0.04
GK-1; 2.5 mg/kg BW	0.41 ± 0.13	0.26 ± 0.17
GK-1; 12.5 mg/kg BW	0.44 ± 0.18	0.16 ± 0.05
Cyclophosphamide; 10 mg/kg BW	1.26 ± 0.24	0.44 ± 0.18

Data were reported as mean ± standard deviation. Micronuclei frequencies were analyzed by the Kruskal-Wallis non-parametric test. Significance was established at $\alpha < 0.05$. MN: micronuclei.

related to the age of the rats [33] and were only observed at the last sampling from the animals.

GK-1 induced an increase in neutrophil levels after repeated injections. Considering that no local reactions were found at the injection site and according to histopathological analysis no neutrophil infiltration was observed in other tissues (brain, spleen, liver, kidney, and lymph nodes), this increase may be related to the adjuvant properties of GK-1, promoting antigen transport from the site of injection to

Table 9. Percentage of chromosomal aberrations in different culture conditions.

GK-1 Concentration (mM)	Cell cultures (24 h) With S-9 fraction	Cell cultures (24 h) Without S-9 fraction	Continued cell cultures (72 h) without S-9 fraction
0	2	2	2
0.001	2	2	1.5
0.01	2	2	2
0.1	3	3	3
Cis-platin		33	47
Cyclophosphamide	9		

lymph nodes, favoring APC activity as previously suggested [34,35]. On the other hand, the differences observed in platelet content in rats of both sexes are attributable to platelet aggregation and are below reference values [36]. All these findings indicate that GK-1 had no undesirable effects on circulating blood cells (Tables 1 and 2).

Liver is the main organ where exogenous and endogenous agents are metabolized. Any damage to the liver results in increased blood levels of substances and enzymes like ALT, AST, glucose, and cholesterol [30,37]. When administered at the lowest dose (0.5 mg/kg), GK-1 induced increased levels of ALT and glucose with respect to the control group in male rats (Table 4). However, the mean value does not exceed reference intervals and the mean increase was due to only one animal at the end of the study. On the other hand, histopathological examination of the liver from all animals under study revealed only minimum to discreet hepatic congestion corresponding to euthanasia of animals by CO₂ asphyxia, unrelated to the experimental protocol and non-associated to ALT and glucose increased levels. No other dose tested showed this increase. Kidney function was not affected by GK-1 administration at any dose level. The safety of GK-1 peptide on essential organ toxicity correlated well with histological findings. Photomicrographs of sections from various organs did not show any alterations in cell structure nor pathological changes.

Another important finding is that GK-1 intravenously administered in rabbits did not induce fever, a finding relatively expected considering that mouse peritoneal macrophages exposed to GK-1 did not produce IL-1 β [38], a well-known pyrogenic cytokine. The *in vivo* test performed in this studio ensures that the peptide is not pyrogenic by itself nor contains pyrogenic contaminants. GK-1 was demonstrated not to induce dermal sensitivity, a finding that supports its potential use for subcutaneously-administered, adjuvanted vaccines such as the influenza vaccine.

Finally, the potential genotoxic of GK-1 was evaluated in this study. This parameter is useful to assess the safety of drugs or novel adjuvants and vaccine additives, since some substances may lead to carcinogenesis [9] and especially considering the synthetical production of the peptide [39]. Three different assays were conducted, the bacterial reverse mutation assay (Ames test), micronucleus test, and chromosomal damage assay, to evaluate the genotoxicity of GK-1 peptide. Chromosome aberrations have been recognized to be an important biomarker of human exposure to genotoxic chemicals. It has been reported that

metabolites secreted by several parasites (i.e. *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*) have a mutagenic effect on mouse somatic and generative cells [40]. Despite being of helminth origin, GK-1 did not induce chromosome aberrations either directly (with no metabolic activator) or through active mutagenic intermediates (with metabolic activators). With regard to micronuclei measurement in erythrocytes and reticulocytes as a marker of cytogenetic damage, it was found that even in the highest doses employed (12.5 mg/kg BW), GK-1 failed to induce micronucleated reticulocytes. An increase in the percentage of reticulocytes was observed, however, which could be explained as some kind of stimulus, similar to the effect of erythropoietin [41], which causes immature erythrocytes to be released to the bloodstream (where we observed them) in larger amounts. Previous observations on bone marrow-derived dendritic cells cultured with fluorescent GK1 have shown that the peptide is found inside cells but does not co-localize with DAPI-stained cell nuclei. Finally, GK-1 did not induce mutagenesis as observed by the assay of bacterial reverse mutation (Ames test). The lack of genotoxicity by GK-1 was expected, considering that GK-1, although synthetically produced, was derived from a parasite protein containing natural amino acids, a condition that forecasts its lack of genotoxicity [39].

Overall, this work demonstrates that GK-1 is a safe substance in the tested animals, given its lack of toxicity and cytotoxic effects.

Conclusions

The GK-1 peptide is a synthetically-produced molecule of whose immunomodulatory effect as a vaccine adjuvant is a solid evidence [3]. The increasing knowledge on how the immune system interacts with pathogens is leading to the formulation of novel vaccines and the improvement of already licensed ones by developing new adjuvants [42], which require preclinical safety assessment to formulate innocuous vaccines.

This work demonstrated the safety of GK-1 peptide through a subchronic (90-day repeated dose), subcutaneous toxicity evaluation. Moreover, genotoxicity studies indicated that the peptide does not induce mutagenicity. This is the first work to evaluate the safety of the GK-1 peptide as a part of preclinical studies, which are essential for the evaluation process required for clinical studies.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial assistance of CONACyT to the doctoral student Jacquelynne Cervantes Torres from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), fellowship 25243. We are grateful to Martha E. Carrasco for her technical assistance to obtain financial support to complete this work, M.Sc. Carlos Castellanos Barba for his support and advice in the use of cytofluorometry equipment, M.Sc. Antonio Araujo for performing the micronucleus assessment, Dr. Renato León Rodríguez for performing lymphocyte cultures, Sandra Hernández-Ojeda for her technical support in the Ames testing, M.Sc. Isabel Muñoz Duarte, Dr. Ruth Bustamante García, MVZ Ramón León Zetina for their support in pathological and

statistical and data analysis, and Juan Francisco Rodriguez for copyediting the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by CONACyT under Grants 224525 and 253891; Fundación Miguel Alemán; and the Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas; UNAM.

References

- [1] Shah RR, Hassett KJ, Brito LA. Overview of vaccine adjuvants: introduction, history, and current status. *Methods Mol Biol.* 2017; 1494:1–13.
- [2] Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:500–513.
- [3] Segura-Velázquez R, Pérez-Torres A, Rosas G, et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine.* 2006;24:1073–1080.
- [4] Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciotto E, et al. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1338–1343.
- [5] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999;67:2522–2530.
- [6] Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, et al. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18:1067–1076.
- [7] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, et al. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a pre-clinical mouse melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013;28:682–690.
- [8] Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, et al. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine.* 2017;35:5653–5661.
- [9] WHO. WHO Technical Report Series No. 927, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, Annex 1. Geneva: WHO; 2005.
- [10] ICH. Guideline M3(M): Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals, CPMP/ICH/286/95 [Internet]. Geneva, Switzerland: International Council for Harmonisation; 2000 [cited 2016 Nov 17]. http://www.iss.it/binary/scf1/cont/ICH_Topic_M_3_R1_.pdf
- [11] Verdier F, Morgan L. Predictive value of pre-clinical work for vaccine safety assessment. *Vaccine.* 2001;20:S21–S23.
- [12] Adams K, Allen JA, Brooker PC, et al. Genotoxicity testing of pido-timid in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung.* 1994;44: 1454–1459.
- [13] Cervantes-Torres J, Segura-Velázquez R, Padilla P, et al. High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr B.* 2017;1060:97–102.
- [14] OECD. Test No. 406: skin sensitisation, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1992.
- [15] Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 1969;52:268–276.
- [16] Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: Suplemento para dispositivos médicos, 3a edición. Prueba de pirógenos MGA 0711 [Pharmacopeia of the Mexican United States: Supplement for Medical Devices, 3rd Edition. Pyrogen Assay AGM 0711]. Mexico City: Secretaría de Salud; 2016 [cited 2018 Apr 04]. <https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/266.pdf>
- [17] FDA. Pyrogen and endotoxins testing, FDA guidance for industry. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2012.
- [18] OECD. Test No. 471: bacterial reverse mutation, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1997.
- [19] OECD. Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1997.
- [20] Weaver J, Torous D. Flow cytometry assay for counting micronucleated erythrocytes: development process. *Methods.* 2000;21: 281–287.
- [21] Dertinger S, Torous D, Hall N, et al. Malaria-infected erythrocytes serve as biological standards to ensure reliable and consistent scoring of micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Mutat Res.* 2000;464:195–200.
- [22] Micronucleus analysis kit, Instructions manual [Internet]. Rochester, NY: Litron Laboratories; 2013 [cited 2018 Aug 16]. Available from: <https://litronlabs.com/getattachment/07178806-b868-4fff-8dd8-d4fb52b1b41e/Instruction-Manual-MicroFlow-BASIC-Rat-Bone-Marr.aspx>
- [23] OECD. Test No. 473: in vitro mammalian chromosome aberration, OECD guideline for the testing of chemicals. Paris, France: OECD; 1997.
- [24] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Sahaza JH, et al. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biother Radiopharm.* 2015;30:247–254.
- [25] Vera-Aguilera J, Perez-Torres A, Beltran D, et al. Novel treatment of melanoma: combined parasite-derived peptide GK-1 and anti-programmed death ligand 1 therapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2017;32:49–56.
- [26] M3(R2): Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. FDA Guidance for Industry. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2010; [cited 2016 Nov 17]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>
- [27] Medina MF, Arencibia DF, López Y, et al. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay [Experimental designs for preclinical toxicology studies at the Finlay Institute]. *Rev Toxicol Linea.* 2009;24:40–54. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/24004.pdf
- [28] Deshpande P, Mohan V, Ingavale D, et al. Preclinical safety assessment of glycosides based standardized fenugreek seeds extract: acute; subchronic toxicity and mutagenicity studies. *J App Pharm Sci.* 2016;6:179–188.
- [29] CPMP. Preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines CPMP/SWP/465/95. London: CPMP; 1997.
- [30] Zhang Y, Zhu K, Cui H, et al. Toxicological evaluation of Oviductus ranae: acute; sub-acute and genotoxicity studies in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2017;203:101–109.
- [31] Tofovic SP, Jackson EK. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:360–366.
- [32] León C, Blanco D, Peña A, et al. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *REDVET.* 2011;12:1–10. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111101.pdf>
- [33] Ahluwalia N, Gordon MA, Handte G, et al. Iron status and stores decline with age in Lewis rats. *J Nutr.* 2000;130:2378–2383.
- [34] de Veer M, Kemp J, Chatelier J, et al. The kinetics of soluble and particulate antigen trafficking in the afferent lymph, and its modulation by aluminum-based adjuvant. *Vaccine.* 2010;28: 6597–6602.

- [35] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159–175.
- [36] Kampfman I, Bauer N, Johannes S, et al. Differences in hematologic variables in rats of the same strain but different origin. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:228–234.
- [37] Hu Z, Feng R, Xiang F, et al. Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of eucalyptus oil-water emulsions. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7:4835–4845.
- [38] Sánchez-Hernández L, Montero L, Mojica-Espinosa R, et al. Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. *Immunol Lett*. 2018;201:20–30.
- [39] Thybaud V, Kasper P, Sobol Z, et al. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing. *Mutagenesis*. 2016;31:375–384.
- [40] Bekish VJ. The alterations in genetic apparatus of somatic and generative cells of the host caused by helminths metabolites. *Wiad Parazytol*. 2001;47:891–896.
- [41] Wiczling P, Krzyzanski W, Żychlińska N, et al. The quantification of reticulocyte maturation and neocytolysis in normal and erythropoietin stimulated rats. *Biopharm Drug Dispos*. 2014;35:330–340.
- [42] Di Pasquale A, Preiss S, Tavares-Da Silva F, et al. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)*. 2015;3:320–343.

Understanding the Anti-Tumor Properties Mediated by the Synthetic Peptide GK-1

Jacquelynne Cervantes-Torres, Laura Montero,
Noé Rodríguez-Rodríguez, Edda Sciutto,
Gladis Fragoso and Diana Torres-García

Additional information is available at the end of the chapter

Abstract

Cancer exhibits adaptive features typical of complex systems, like resilience and robustness to environmental challenges through the emergent co-evolution of its components. These events promote carcinogenesis through dynamic interactions among numerous components and subsystems, including the immune system. During the past decade, our research group has provided substantial evidence that the peptide GK-1 has important immunomodulatory properties. In elderly mice, GK-1 acts as a potent adjuvant of the influenza vaccine through a mechanism that involves the activation of antigen-presenting cells (APCs) and an increased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IFN- γ , TNF α , CCL2). To date, there is solid evidence supporting the antitumoral properties of GK-1 in murine cancer models. First, a lower occurrence and smaller size of spontaneous bronchiolar adenomas were found in elderly GK-1-treated mice compared to paired untreated mice. In two independent studies, GK-1 treatment reduced tumor growth and increased mouse survival in a murine model of melanoma and breast tumor. In the former model, a synergy between GK-1 and anti-PD-L1 treatment was observed, while in the latter, GK-1 alone controlled the metastatic burden. The effective activation of APCs induced by GK-1, restoring the antitumor-specific immunity, may underlie some of its antineoplastic effects.

Keywords: GK-1 peptide, melanoma, breast cancer, immunomodulator, antitumor

1. Introduction

1.1. Immunomodulation

Immunosurveillance comprises interactions between the immune system and cancer cells that take place even before the tumor formation [1, 2]. This process includes the recognition and control of transformed cells through antitumor immune responses, with three related outcomes: elimination, equilibrium, and escape [1–5]. In this regard, stimulating the innate immune system by immunogenic cells plays a role in the removal of incipient tumors, activating cells from the adaptive response like T and B cells, as well as promoting acute inflammation due to the concomitant production of immunostimulatory cytokines. Nevertheless, some transformed cells may not be eliminated. This escape phase of immunosurveillance is characterized by tumor growth promotion through a phenomenon called tumor-induced tolerance, which involves an increased expression of immunosuppressive components such as myeloid-derived suppressor cells (MDSC), regulatory T cells (Tregs), as well as T cell exhaustion and the production of immunosuppressive soluble factors [6, 7]. Indeed, some of these cells could be used as prognosis factors, since increased numbers of Treg and MDSC cells are related to a poorer outcome in cancer patients [8–13]; by contrast, a Th1 response is associated with a good prognosis in melanoma, breast, head, neck, colorectal, prostatic, and renal cancer [14–16].

The immune response can be modulated by compounds capable of enhancing (immunopotential) or diminishing (immunosuppression) the immune response, either in an antigen-specific or in a nonspecific manner; the latter implies that the immune system requires to be stimulated to restore the patient's immunocompetence. Immunomodulators are biological or nonbiological substances that can modify one or more components of the immunoregulatory network to achieve a specific antitumor immunity, such as inducing effector tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), activating macrophages and natural killer (NK) cells, and/or promoting the production of inflammation mediators [17–21].

Immunomodulators include adjuvants, vaccines, and immunoglobulins used to prevent or treat infectious diseases. They are characterized by their ability to activate cells of the innate immune system, mainly dendritic cells (DCs) and macrophages. Some examples of this type of agents are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and molecules like squalene, aluminum salts, and peptides, which are often used as adjuvants in vaccines [21, 22].

1.2. Peptide-based therapies

Anticancer strategies based on peptides have several advantages over other chemotherapeutic approaches, like being nongenotoxic or possessing adjuvant properties; they also have a strong specificity, high affinity, good tissue penetration, and low toxicity with respect to small-molecule drugs and monoclonal antibodies [23–26]. Examples of anticancer peptides are (1) necrotic peptides (some of them are expressed in a wide diversity of species, including insects, fish, amphibians, and mammals, e.g., cecropins A and B found in mammals and various insects) [27]; (2) apoptotic peptides, cationic peptides known as host defense peptides (HDP) such as the bovine lactoferricin, magainin 2, hCAP109-135 (comprising the C-terminal

domain of human CAP18), and BMAP-28 from bovine myeloid cathelicidin [28–31]; (3) blocking peptides; (4) receptor-interacting peptides; (5) peptides that bind to cell-adhesion proteins; (6) protein kinase inhibitors; (7) protease inhibitors; (8) peptides with antiangiogenic properties; and (9) peptides with immunostimulatory activity [27].

With regard to receptor-interacting peptides, compounds like CpG, imiquimod, poly I:C (toll-like receptor (TLR) agonists), α -GalCer (glycolipid ligands), GM-CSF, IL-2, and IFN α/β have antitumoral activity, as well as adjuvant properties [32–34]. These compounds are capable of directly or indirectly enhancing APC functions and T effector activity. In this sense, some of the most employed immunotherapeutic agents in polytherapy induce the effector function of tumor microenvironment (TM)-associated T cells and macrophages [35–38]. For instance, CpG was a promising cancer immunotherapy adjuvant due to its capacity to induce a Th1 immune response and activate APCs through TLR9 signaling [35–38]; however, it failed to stimulate the immune response in clinical trials [39]. The identification of new adjuvants showing low toxicity and capable of stimulating a cellular Th1 response in humans would be a great advancement in the development of vaccines for infectious and noninfectious diseases such as cancer [40].

Unfortunately, several immunostimulators have failed to revert the immunosuppressive conditions in TM. For example, IL-2, IL-12, GM-CSF [41–44], and immunological adjuvants administered with highly immunogenic antigens like incomplete Freund's adjuvant, bacillus Calmette-Guerin [BCG], and MF59 have shown disappointing results [43, 44]. Moreover, these compounds have been associated with toxic effects [45–47].

2. Identification of the GK-1 peptide

Based on the nonspecific reactivity and immunopotentiator properties of GK-1, our group has been studying it as a promising adjuvant for cancer immunotherapy. This 18-amino acid peptide was first derived from the KETc7 protein, isolated from a *Taenia crassiceps* cysticercus cDNA library [48]; KETc7 is part of a broad family of proteins associated with membrane processes [49]. When searching for T cell epitopes *in silico*, GK-1 exhibited a strong association with MHC-I and, to a lesser extent, with MHC-II [49]. The immunomodulatory properties of GK-1 are associated with an efficient activation of cells involved in antigen presentation (such as DCs) by promoting the expression of the costimulatory molecules CD86 and MHC-II, as well as the secretion of soluble pro-inflammatory factors like IFN- γ , TNF- α , and CCL2 [50]. GK-1-treated DCs enhanced the proliferative response of antigen-specific CD4⁺ T cells both *in vivo* and *in vitro* [50]. GK-1 also induced the proliferation of CD8⁺ T cells and higher IFN- γ levels [51] even in the absence of adjuvant [52]. Considering that this peptide can promote APC function and enhance Th1 cell effector pathways, its capacity as an adjuvant of the influenza vaccine was evaluated. GK-1 increased the levels of specific IgG antibodies *in vivo*, before and after infection, in a murine model of influenza in elderly mice [53], favoring virus clearance after infection in both young and aged mice, which could be associated with an early infiltrate of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages) to the lung parenchyma following the GK-1 peptide co-administration. Furthermore, lung histological examination showed better preserved alveolar spaces and less congested alveolar walls with respect to the vaccine-only animals [53].

3. GK-1 as an anticancer immunotherapy

In neoplasms, the host is often immunocompromised due to the presence of immunosuppressive cells and molecules in the TM, to prevent the removal of cancer cells [2]. This highlights the relevance of stimulating the host immune response against cancer antigens by administering immunoadjuvants along with chemotherapy, radiotherapy, or surgery [54]. In this regard, small peptides with a nonspecific immunostimulatory response like GK-1, long known to act as vaccine adjuvants, are potentially useful in cancer therapy. The antitumor effect of GK-1 has been studied in melanoma and breast cancer murine models.

3.1. GK-1 in a mouse melanoma model

Melanoma is the most malignant form of skin cancer, mainly affecting the Caucasian population [55, 56]. Until recently, systemic therapy for metastatic melanoma had been inefficient, with a 5-year survival rate for patients (<30%) [57, 58]. However, new therapies were recently approved to treat melanoma, such as pegylated-interferon- α 2b (IFN- α 2b) in the adjuvant setting; ipilimumab, an anti-CTLA4 monoclonal antibody, for metastatic disease; vemurafenib, an oral BRAF inhibitor indicated for patients with metastatic melanoma harboring BRAFV600 mutations, and more recently antibodies against PD-1 like pembrolizumab [59–61] and antibodies blocking PD-L1 pathways, as well as inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Additionally, nonspecific immunomodulation by several cytokines (IL-2, IL-12, TNF- α , and IFN- γ) and TLR ligands [62–64] in addition to adoptive transfer approaches have been widely used [65]. For over a decade, DCs have also been used in immunotherapy against various types of cancer [66–68] as an alternative to chemotherapy, by vaccination with DCs loaded with tumor peptides (i.e., MAGE-AX [69–72] and/or with necrotic or apoptotic tumor cells to induce effector tumor-specific T cells [73, 74]). The efficacy of this immunotherapeutic approach was also evaluated against murine melanoma, using GK-1 as an immunostimulant.

GK-1 has been reported to increase the mean survival and significantly delays tumor growth in a melanoma model with B16-F10 cells, showing more necrotic areas along with the presence of numerous neutrophils (**Figure 1**). Neutrophilia inside pulmonary blood vessels was also observed, without evidence of macroscopic or microscopic metastasis. In a melanoma lung metastatic model, GK-1 decreased lymphocyte count, while increased the number of neutrophils and decreased the serum levels of IFN- γ ; on the other hand, an increase in the levels of IFN- γ and IL-12 in the intratumor (lung metastases) environment, along with a decrease in IL-17, IL-4, IL-22, and IL-23 was also observed [75, 76]. The antitumor activities of IL-12 have been established in preclinical studies against various tumor cell lines; the increased concentration of the antitumor cytokine IL-12 found in primary tumors may enhance the damage to tumor cells, limiting the number of cancer cells detaching from the primary tumor [77–79]. Its antitumor activity is also mediated by the induction of IFN- γ [67, 78, 80], which upregulated the expression of MHC-I and -II by B16 cells *in vitro*, favoring a cytolytic response in MHC-I-restricted CTL (**Figure 1**) [81]. There is a consensus that the induction of a Th1 profile or the release of cytokines like IFN- γ and TNF- α by T cells is essential for an effective antitumor immune response in

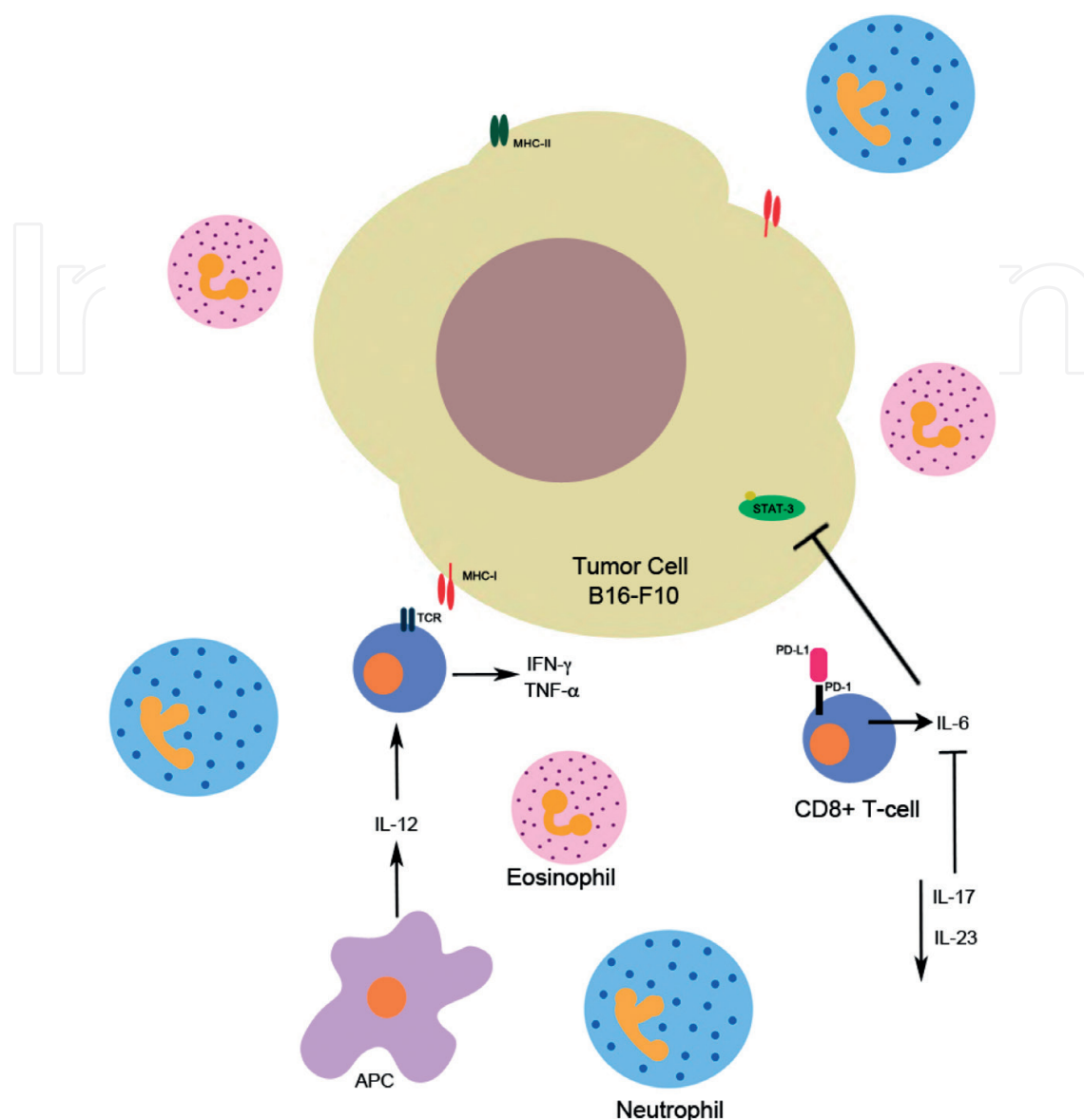


Figure 1. GK-1 in a preclinical mouse melanoma model. In a melanoma murine model with B16-F10 cells, GK-1 led to an increase in neutrophils with the increase of IFN- γ and IL-12 cytokines, along with a decrease in IL-17 and IL-23. On the other hand, the MAGE-AX/GK-1 treatment showed an increase in areas of cell death, characterized by eosinophilic regions and production of IFN- γ by CD8+ T-cells.

melanoma [82–84]. In fact, IFN- γ released from CTLs has been considered as a potent mediator of the antitumor response in bulky melanoma tumors [17, 85]. In contrast, IL-17 was proved to directly promote tumor growth and angiogenesis [86–88]. Indeed, it has been shown that IL-17 can promote tumor growth by a direct effect on IL-6 induction, which in turn activates STAT3 in both tumor and nontransformed cells in the TM [89]. Finally, IL-23 is an important molecular driver of Th17 cells in humans; IL-23 is increased in several tumors, and the expression of this cytokine antagonistically regulates local inflammatory responses in the TM, as well as the infiltration of epithelial lymphocytes [80]. Thus, the intratumoral subexpression of IL-17 and IL-23 in GK-1-treated mice could explain the reduced tumor progression (**Figure 1**).

Considering the capacity of GK-1 to enhance DC activation [50], BMDCs matured with TNF- α and stimulated with GK-1 and MAGE-AX were administered to tumor-bearing mice in the melanoma model with B16-F10 cells; the treatment with MAGE-AX/GK-1 increased survival rates, while mice receiving GK-1 alone had a smaller increase in survival. Moreover, the combination MAGE-AX/GK-1 significantly delayed tumor growth and increased cell death areas, characterized by eosinophilic regions within melanomas. Similarly, both GK-1 alone and MAGE-AX/GK-1 increased the production of IFN- γ -producing CD8 cells, while GK-1 increased the percentage of IL-10 producing CD8+ T-cells [90]. The effect of MAGE-AX/GK-1 could be associated with higher levels of CD8+ lymphocytes in peritumoral lymph nodes, which have been correlated with the survival of patients suffering from melanoma and other cancer types [67, 91, 92].

Vera-Aguilera et al. [79] hypothesized that a combined GK1/anti-PD-L1 therapy could synergize and maximize the individual antitumor effect and extend survival. An increased survival was observed in mice treated with GK1/anti-PD-L1, as well as in mice treated with GK-1 or PD-L1 alone. Animals treated with GK1/anti-PD-L1 had smaller tumor masses. Additionally, GK1/anti-PD-L1 decreased the serum levels of IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10. The mechanism by which the combined GK1/anti-PD-L1 treatment improved survival rates remains to be determined; however, the expression of PD-1 on T cells has been proved to be upregulated by IL-6 through the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [93], a point of convergence for several oncogenic signaling pathways leading to the expression of immunosuppressing molecules [94]. Similarly, the expression of PD-L1 and PD-L2 is also upregulated by numerous mechanisms, including the production of IL-4 and GM-CSF [93]. All these findings point to a possible synergistic mechanism associated with the reversion from an exhausted phenotype.

3.2. GK-1 in a breast cancer model

Considering the evidence described above, it is now clear that changes in the microenvironment could induce an antitumor response against the primary tumor and reduce the metastatic disease, which could allow us to control cancer progression. In this regard, immunomodulators like GK-1 can be used as anticancer therapies. In 2017, GK-1 was evaluated in a murine model of invasive breast adenocarcinoma, which spontaneously metastasizes to the lungs, liver, brain, and bone, similarly to breast cancer in humans [95–98]. GK-1 was associated with an increased survival in 4T1 tumor-bearing mice and a reduction in the primary tumor volume rate, which was accompanied by an increase of tumor cell death areas with morphologic features associated with necrosis (pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis) and apoptosis (apoptotic bodies) at the primary tumors. These findings, along with an increase in IL-12 concentration in the primary tumor, denote deep changes in the TM induced by GK-1 [98], which could involve the infiltration of TCD8+, NK, and NKT cells in the primary tumor [77, 99, 100] (**Figure 2**). As described in the previous section, IL-12 has been associated with antitumor and antiangiogenic activities [100, 101], due to its capacity of inducing the infiltration of TCD8+ cells within tumor tissues [100]. In fact, it has been reported that a combined treatment with tamoxifen and IL-12 enhanced tumor inhibition due to an increase in apoptosis, and reduced tumor growth in a 4T1 cancer murine model [100].

Those changes suppose a TM that could reduce the tumor growth rate, and the concomitant reduction of cancer cell egress by detachment from the primary tumor, which allows them to invade the stroma and break the basement membrane. These changes could explain the reduction of pulmonary metastasis associated with the GK-1 treatment [98]. Additionally, changes in lung microenvironment associated with the GK-1 treatment have been reported. In this sense, a reduction in the concentration of b-FGF, CCL-3, GM-CSF, CCL-2, TNF- α , and CXCL-9, along with an increased concentration of IL-6 has been found [98] (**Figure 2**). These changes could reduce metastasis development, possibly by inhibiting the proliferation of cells that are essential for the growth of secondary tumors, such as macrophage-associated metastasis (MAM) and MDSC [102, 103]. Considering these results, GK-1 could change the tumor microenvironment, inducing an active antitumoral immune response that could lead to a decrease in cancer burden.

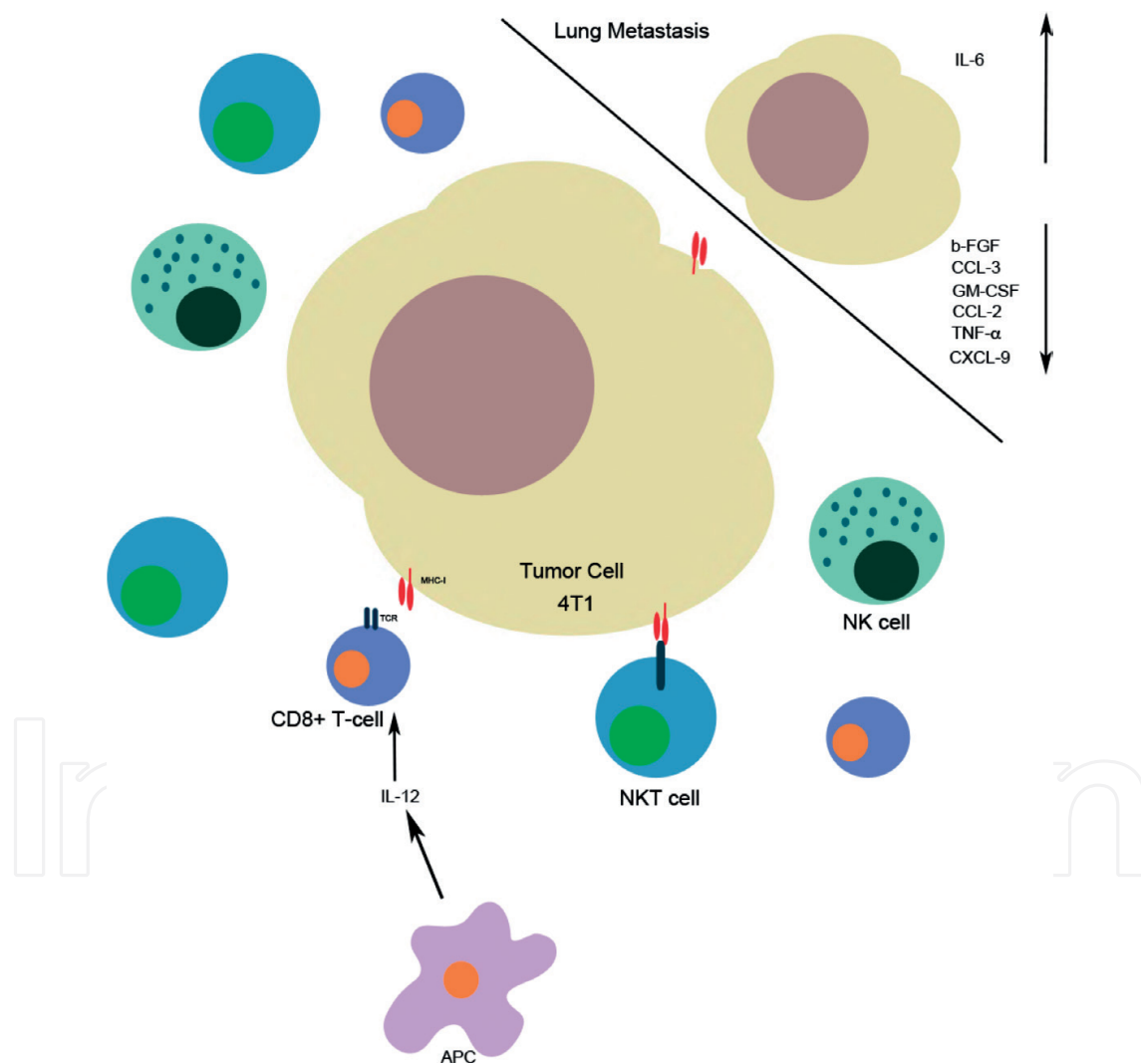


Figure 2. GK-1 in a breast cancer model. GK-1 was associated with an increased IL-12 concentration in the primary tumor, which could involve the infiltration of CD8+ T-cells, NK, and NKT cells. IL-12 is a cytokine produced principally by APC, such as monocytes, macrophages, and dendritic cells. This cytokine can induce specific CD8+ T-cells that are primed against tumor antigens and could serve as a tumor-specific CTL. Additionally, in the lungs, the GK-1-treatment induces a reduction in the concentration of b-FGF, CCL-3, GM-CSF, CCL-2, TNF- α , and CXCL-9, along with an increased concentration of IL-6, which correlates with a minor lung-metastatic burden.

4. Discussion

The ability of the GK-1 peptide to increase survival, significantly to delay tumor growth, and to reduce metastasis is discussed in this review. Considering that the immune system plays a crucial role in the outcome of cancer, orchestrating the response that may lead either to the control or dissemination of tumors [8, 78, 104], understanding the mechanisms that underlie the efficient response to the peptide is imperative.

It has been reported that the production of pro-inflammatory cytokines both by tumor and surrounding cells, along with the production of growth factors and chemokines, can promote the development of neoplasia by facilitating carcinogenesis programs, inducing a sustained cellular proliferative rate, inhibiting apoptosis and stimulating angiogenesis [105, 106]. As described above, GK-1 therapy contributed to decrease the levels of IL-4, IL-10, b-FGF, and GM-CSF; these chemoattractants, along with hypoxia, promote macrophage shift from a M1 to a M2 phenotype. M2-like tumor-associated macrophages (TAM) stimulate immunosuppression and increase blood vessel density, favoring angiogenesis. In a breast cancer model, lower CCL2 and CCL3 levels in the lungs of mice treated with GK-1 could be decreasing the migration of inflammatory monocytes such as MAM and MDSC, which promote metastasis [8, 13, 102, 107]. These changes in the microenvironment seem to contribute to control tumor burden and metastasis.

On the other hand, M1-like macrophages can contribute to tumor regression by recruiting cytotoxic CD8⁺ T (CTL) and NK cells [108–110]. In this regard, IL-12 induction by APCs could be contributing to the increase in the proliferation of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes and the induction of a Th1 response, as previously reported [51, 52, 111]. Several studies have suggested a correlation of higher density levels of cytotoxic (CTL) and memory T lymphocytes (CD3⁺ CD45RO⁺) infiltrated in the primary tumor with increased survival rates of patients with different types of neoplasms [91, 112–116].

According to recent findings, the GK-1 peptide can induce a M1 phenotype and promote the efficient activation of DCs, which could be leading to the maintenance of an effector response against tumor growth, capable of counteracting the immunosuppressive response due to T cell exhaustion or DC dysfunction.

5. Conclusions

Considering the possible mechanisms of action of GK-1 and the information available, we propose that this peptide can decrease tumor growth and metastasis by changing the tumor microenvironment. GK-1 appears to reactivate the immune system affected by the tumor-associated suppressive microenvironment, thereby allowing immune cells to become activated. Although more studies focusing on the anticancer effect of GK-1 are required, this research gives new evidence on the possible clinical uses of GK-1 beyond its well-established adjuvant effect.

These results have also provided us with the rationale to evaluate the effectiveness of the GK-1 immunotherapy to revert the exhaustion of peripheral T-cells in several types of cancer.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (253891), Fundación Miguel Alemán, and the Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

The authors acknowledge the financial assistance of CONACyT to the doctoral students Jacquelynne Cervantes-Torres, Laura Montero-León, and Diana Torres-García from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who received the fellowships 25243, 29951, and 245638, respectively. This manuscript is part of the doctoral thesis of the students from the Instituto de Investigaciones Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Abbreviations

APC	antigen-presenting cell
CCL-22	chemokine ligand-22
CTL	cytotoxic T lymphocytes
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	dendritic cell
HDP	host defense peptides
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
NK	natural killer cells
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
Treg	regulatory T cell
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TM	tumor microenvironment
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2

Author details

Jacquelynn Cervantes-Torres[†], Laura Montero[†], Noé Rodríguez-Rodríguez, Edda Sciutto, Gladis Frago and Diana Torres-García*

*Address all correspondence to: dianatg@comunidad.unam.mx

Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Ciudad de México, Mexico

[†] First joined authors

References

- [1] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;**21**(2):137-148. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
- [2] Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;**117**(5):1137-1146. DOI: 10.1172/JCI31405
- [3] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;**121**(1):1-14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
- [4] Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: Antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013; **1284**:1-5. DOI: 10.1111/nyas.12105
- [5] Khodadoust MS, Alizadeh AA. Tumor antigen discovery through translation of the cancer genome. *Immunologic Research*. 2014;**58**(2-3):292-299. DOI: 10.1007/s12026-014-8505-4
- [6] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*. 2006;**6**(4):295-307. DOI: 10.1038/nri1806
- [7] Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology*. 2010;**22**:223-230. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.005
- [8] Bennaceur K, Chapman J, Brikci-Nigassa L, Sanhadji K, Touraine JL, Portoukalian J. Dendritic cells dysfunction in tumour environment. *Cancer Letters*. 2008;**272**(2):186-196. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.017
- [9] Li Q, Li Q, Chen J, Liu Y, Zhao X, Tan B, Ai J, Zhang Z, Song J, Shan B. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology Reports*. 2013;**30**(3):1215-1222. DOI: 10.3892/or.2013.2570
- [10] Jie HB, Schuler PJ, Lee SC, Srivastava RM, Argiris A, Ferrone S, Whiteside TL, Ferris RL. CTLA-4⁺ regulatory T cells increased in cetuximab-treated head and neck cancer patients suppress NK cell cytotoxicity and correlate with poor prognosis. *Cancer Research*. 2015;**75**(11):2200-2210. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2788

- [11] Santoiemma PP, Powell DJ Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2015;**16**(6):807-820. DOI: 10.1080/15384047.2015.1040960
- [12] Chen J, Chen Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Medical Oncology*. 2014;**31**(8):82. DOI: 10.1007/s12032-014-0082-9
- [13] Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*. 2018;**19**(2):108-119. DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x
- [14] Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, Camus M, Gillard M, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;**138**(4):1429-1440. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.057
- [15] Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: The role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current Opinion in Immunology*. 2013;**25**(2):261-267. DOI: 10.1016/j.coi.2013.03.004
- [16] Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: Prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013;**39**(1):11-26. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.008
- [17] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;**298**(5594):850-854. DOI: 10.1126/science.1076514
- [18] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*. 2004;**10**(9):909-915. DOI: 10.1038/nm1100
- [19] Ishizuka M, Kawatsu M, Yamashita T, Ueno M, Takeuchi T. Low molecular weight immunomodulators produced by microorganisms. *International Journal of Immunopharmacology*. 1995;**17**(2):133-139. DOI: 10.1016/0192-0561(94)00086-4
- [20] Fauci AS, Rosenberg SA, Sherwin SA, Dinarello CA, Longo DL, Lane HC. Immunomodulators in clinical medicine. NIH conference. *Annals of Internal Medicine*. 1987;**106**(3):421-433. DOI: 10.7326/0003-4819-106-3-421
- [21] Bellanti J. Immunology IV: Clinical applications in health and disease. *World Allergy Organization Journal*. 2012;**5**(8):94. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182641db0
- [22] Pichichero ME. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. *Human Vaccines*. 2008;**4**(4):262-270
- [23] Janin YL. Peptides with anticancer use or potential. *Amino Acids*. 2003;**25**(1):1-40. DOI: 10.1007/s00726-002-0349-x
- [24] Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2006;**15**(8):933-946. DOI: 10.1517/13543784.15.8.933

- [25] Rüegg C, Hasmim M, Lejeune FJ, Alghisi GC. Antiangiogenic peptides and proteins: From experimental tools to clinical drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;**1765**(2):155-177. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.09.003
- [26] Kaplan N, Morpurgo N, Linial M. Novel families of toxin-like peptides in insects and mammals: A computational approach. *Journal of Molecular Biology*. 2007;**369**(2):553-566. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.106
- [27] Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology*. 2008;**26**(4):210-217. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.01.002
- [28] Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macrì F, Skerlavaj B, Zanetti M, Gennaro R, Bernardi P. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;**22**(6):1926-1935. DOI: 10.1128/MCB.22.6.1926-1935.2002
- [29] Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Shibata T, Hirata M, Isogai H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Letters*. 2004;**212**(2):185-194. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.04.006
- [30] Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttmann H, Sell M, Paulsen F, Harder J, Unteregger G, Stöckle M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *European Urology*. 2006;**50**(1):141-147. DOI: 10.1016/j.eururo.2005.12.043
- [31] Mader JS, Richardson A, Salsman J, Top D, de Antueno R, Duncan R, Hoskin DW. Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Experimental Cell Research*. 2007;**313**(12):2634-2650. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.05.015
- [32] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;**413**(6857):732-738. DOI: 10.1038/35099560
- [33] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*. 2002;**20**:709-760. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
- [34] Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: Bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;**75**(5):749-755. DOI: 10.1189/jlb.1103543
- [35] Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997;**186**(10):1623-1631. DOI: 10.1084/jem.186.10.1623
- [36] Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;**94**(20):10833-10837. DOI: 10.1073/pnas.94.20.10833

- [37] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*. 2001;**31**(10):3026-3037. DOI: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<#60;3026::AID-IMMU3026>3.0.CO;2-H
- [38] Krieg AM. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2006;**5**(6):471-484. DOI: 10.1038/nrd2059
- [39] Schmidt C. Clinical setbacks for toll-like receptor 9 agonists in cancer. *Nature Biotechnology*. 2007;**25**(8):825-826. DOI: 10.1038/nbt0807-825
- [40] Mocellin S, Pilati P, Nitti D. Peptide-based anticancer vaccines: Recent advances and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;**16**(36):4779-4796. DOI: 10.2174/092986709789909648
- [41] Borrello I, Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: A review of the clinical experience. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;**13**(2):185-193. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00034-X
- [42] Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;**13**(2):155-168. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00032-6
- [43] Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: Vaccines for solid tumours. *The Lancet Oncology*. 2004;**5**(11):681-689. DOI: 10.1016/S1470-2045(04)01610-9
- [44] Choudhury A, Mosolits S, Kokhaei P, Hansson L, Palma M, Mellstedt H. Clinical results of vaccine therapy for cancer: Learning from history for improving the future. *Advances in Cancer Research*. 2006;**95**:147-202. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)95005-2
- [45] Ribas A, Amarnani SN, Buga GM, Butterfield LH, Dissette VB, McBride WH, Glaspy JA, Ignarro LJ, Economou JS. Immunosuppressive effects of interleukin-12 coexpression in melanoma antigen gene-modified dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Therapy*. 2002;**9**(11):875-883. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700512
- [46] Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*. 2004;**64**(17):6337-6343. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0757
- [47] Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Annals of Oncology*. 2007;**18**(2):226-232. DOI: 10.1093/annonc/mdl158
- [48] Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunology Letters*. 1996;**49**(3):185-189. DOI: 10.1016/0165-2478(96)02503-5

- [49] Bobes RJ, Navarrete-Perea J, Ochoa-Leyva A, Anaya VH, Hernández M, Cervantes-Torres J, Estrada K, Sánchez-Lopez F, Soberón X, Rosas G, Nunes CM, García-Varela M, Sotelo-Mundo RR, López-Zavala AA, Gevorkian G, Acero G, Laclette JP, Fragoso G, Sciutto E. Experimental and theoretical approaches to investigate the immunogenicity of *Taenia solium*-derived KE7 antigen. *Infection and Immunity*. 2017;**85**(12):e00395-e00317. DOI: 10.1128/IAI.00395-17
- [50] Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;**16**(9):1338-1343. DOI: 10.1128/CVI.00106-09
- [51] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity*. 1999;**67**(5):2522-2530
- [52] Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, Segura R, Goldbaum FA, Sciutto E, Rosas G. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;**18**(7):1067-1076. DOI: 10.1128/CVI.05030-11
- [53] Segura-Velázquez R, Pérez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, Corral R, Rosetti F, Fragoso G, Grinstein S, Sciutto E. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine*. 2006;**24**(8):1073-1080. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.09.014
- [54] Ocaña MC, Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MÁ. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. *Medicinal Research Reviews*. 2018. DOI: 10.1002/med.21511
- [55] Brown CK, Kirkwood JM. Medical management of melanoma. *The Surgical Clinics of North America*. 2003;**83**(2):283-322, viii. DOI: 10.1016/S0039-6109(02)00187-1
- [56] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;**68**(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21442
- [57] Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, Buzaid AC, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004;**54**(3):131-149. DOI: 10.3322/canjclin.54.3.131
- [58] Miao Y, Hylarides M, Fisher DR, Shelton T, Moore H, Wester DW, Fritzberg AR, Winkelmann CT, Hoffman T, Quinn TP. Melanoma therapy via peptide-targeted {alpha}-radiation. *Clinical Cancer Research*. 2005;**11**(15):5616-5621. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0619

- [59] Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Salès F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U, EORTC melanoma group. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: Final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*. 2008;**372**(9633):117-126. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61033-8
- [60] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2010;**363**(8):711-723. DOI: 10.1056/NEJMoa1003466
- [61] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, GA MA, BRIM-3 study group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*. 2011;**364**(26):2507-2516. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
- [62] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2004;**4**(1):11-22. DOI: 10.1038/nrc1252
- [63] Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*. 2009;**1**(6): 949-964. DOI: 10.2217/imt.09.70
- [64] Gnjatic S, Sawhney NB, Bhardwaj N. Toll-like receptor agonists: Are they good adjuvants? *Cancer Journal*. 2010;**16**(4):382-391. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3181eaca65
- [65] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2008;**8**(4):299-308. DOI: 10.1038/nrc2355
- [66] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;**392**(6673):245-252. DOI: 10.1038/32588
- [67] Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8⁺ T-cell immunity. *Journal of Immunotherapy*. 2006;**29**(5):545-557. DOI: 10.1097/01.cji.0000211309.90621.8b
- [68] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews. Cancer*. 2012;**12**(4):265-277. DOI: 10.1038/nrc3258
- [69] Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Köhler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *International Journal of Cancer*. 2000;**86**(3):385-392. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000501)86:3<385::AID-IJC13>3.0.CO;2-T

- [70] Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;**195**(10):1279-1288. DOI: 10.1084/jem.20012100
- [71] Slingluff CL Jr, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;**21**(21):4016-4026. DOI: 10.1200/JCO.2003.10.005
- [72] Trepikak R, Berntsen A, Hadrup SR, Bjørn J, Geertsen PF, Straten PT, Andersen MH, Pedersen AE, Soleimani A, Lorentzen T, Johansen JS, Svane IM. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: Results from a phase I/II trial. *Cytotherapy*. 2010;**12**(6):721-734. DOI: 10.3109/14653241003774045
- [73] Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;**95**(16):9482-9487. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9482
- [74] Cornforth AN, Fowler AW, Carbonell DJ, Fan E, Dillman RO. Characterization of interferon- γ -treated melanoma tumor cells for use in dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2011;**26**(3):345-351. DOI: 10.1089/cbr.2011.0959
- [75] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, Estrada-Bárceñas D. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2013;**28**(9):682-690. DOI: 10.1089/cbr.2012.1438
- [76] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Sahaza JH, Vera-Aguilera C, Moreno-Aguilera E, Pulido-Camarillo E, Nuñez-Ochoa L, Jeganathan P. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2015;**30**(6):247-254. DOI: 10.1089/cbr.2015.1835
- [77] Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: Mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *Journal of Immunology*. 2000;**165**(5):2665-2670
- [78] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nature Reviews. Immunology*. 2006;**6**(11):836-848. DOI: 10.1038/nri1961 Review
- [79] Vera-Aguilera J, Perez-Torres A, Beltran D, Villanueva-Ramos C, Wachtel M, Moreno-Aguilera E, Vera-Aguilera C, Ventolini G, Martínez-Zaguilán R, Sennoune SR. Novel

treatment of melanoma: Combined parasite-derived peptide GK-1 and anti-programmed death ligand 1 therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2017;**32**(2):49-56. DOI: 10.1089/cbr.2016.2123

- [80] Teng MW, Andrews DM, McLaughlin N, von Scheidt B, Ngiow SF, Möller A, Hill GR, Iwakura Y, Oft M, Smyth MJ. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;**107**(18):8328-8333. DOI: 10.1073/pnas.1003251107
- [81] Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *Journal of Immunology*. 1998;**161**(2):897-908
- [82] Ossendorp F, Toes RE, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunology Letters*. 2000;**74**(1):75-79. DOI: 10.1016/S0165-2478(00)00252-2
- [83] Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;**71**(4):565-581. DOI: 10.1189/jlb.71.4.565
- [84] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005;**54**(8):721-728. DOI: 10.1007/s00262-004-0653-2
- [85] Palmer DC, Chan CC, Gattinoni L, Wrzesinski C, Paulos CM, Hinrichs CS, Powell DJ Jr, Klebanoff CA, Finkelstein SE, Fariss RN, Yu Z, Nussenblatt RB, Rosenberg SA, Restifo NP. Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;**105**(23):8061-8066. DOI: 10.1073/pnas.0710929105
- [86] Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, Laurence A, Michalowska A, Mamura M, Lonning S, Berzofsky JA, Wakefield LM. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Research*. 2008;**68**(10):3915-3923. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0206
- [87] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*. 2010;**10**(4):248-256. DOI: 10.1038/nri2742
- [88] Xiao M, Wang C, Zhang J, Li Z, Zhao X, Qin Z. IFN-gamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. *Cancer Research*. 2009;**69**(5):2010-2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3479
- [89] Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;**206**(7):1457-1464. DOI: 10.1084/jem.20090207
- [90] Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez MÁ, Hernández-Téllez B, Jarquín-Yáñez K, Castell-Rodríguez AE. GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *Journal of Immunology Research*. 2014;**2014**:158980. DOI: 10.1155/2014/158980

- [91] Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;**77**(7):1303-1310. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5
- [92] Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British Journal of Cancer*. 2017;**117**(4):451-460. DOI: 10.1038/bjc.2017.220
- [93] Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;**36**(9):587-595. DOI: 10.1016/j.tips.2015.06.005 Review
- [94] Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*. 2012;**118**(9):2476-2485. DOI: 10.1002/cncr.26511
- [95] Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Research*. 1992;**52**(6):1399-1405
- [96] Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of *Staphylococcal aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Research*. 2000;**60**(10):2710-2715
- [97] Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;**279**(45):46659-46667. DOI: 10.1074/jbc.M407952200
- [98] Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, Orbe U, Servín-Blanco R, Fragoso G, Sciutto E. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine*. 2017;**35**(42):5653-5661. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.08.060
- [99] Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;**178**(4):1223-1230
- [100] Yang SX, Wei WS, Ouyan QW, Jiang QH, Zou YF, Qu W, Tu JH, Zhou ZB, Ding HL, Xie CW, Lei QM, Zhong CR. Interleukin-12 activated CD8+ T cells induces apoptosis in breast cancer cells and reduces tumor growth. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;**84**:1466-1471. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.046
- [101] Shi X, Cao S, Mitsushashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *Journal of Immunology*. 2004;**172**(7):4111-4122

- [102] Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;**212**(7):1043-1059. DOI: 10.1084/jem.20141836
- [103] Gargett T, Christo SN, Hercus TR, Abbas N, Singhal N, Lopez AF, Brown MP. GM-CSF signalling blockade and chemotherapeutic agents act in concert to inhibit the function of myeloid-derived suppressor cells in vitro. *Clinical & Translational Immunology*. 2016;**5**(12):e119. DOI: 10.1038/cti.2016.80
- [104] Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: A focus on T-regulatory cells. *Immunology and Cell Biology*. 2018;**96**(1):21-33. DOI: 10.1111/imcb.1003
- [105] Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;**130**(6):1091-1103. DOI: 10.1007/s00418-008-0530-8
- [106] Wolczyk D, Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Grabowski K, Sikorski AF, Augoff K. TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cellular Oncology (Dordrecht)*. 2016;**39**(4):353-363. DOI: 10.1007/s13402-016-0280-x
- [107] Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;**475**(7355):222-225. DOI: 10.1038/nature10138
- [108] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2010;**10**(2):116-129. DOI: 10.1038/nrc2780
- [109] Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;**212**(4):435-445. DOI: 10.1084/jem.20150295
- [110] Jarosz-Biej M, Kamińska N, Matuszczak S, Cichoń T, Pamuła-Piłat J, Czapla J, Smolarczyk R, Skwarzyńska D, Kulik K, Szala S. M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma. *PLoS One*. 2018;**13**(1):e0191012. DOI: 10.1371/journal.pone.0191012
- [111] Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Scitutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003;**93**(3-4):81-90. DOI: 10.1016/S0165-2427(03)00071-0
- [112] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003;**348**(3):203-213. DOI: 10.1056/NEJMoa020177

- [113] Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;**28**(1):e26-e23. DOI: 10.1097/00006676-200401000-00023
- [114] Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *International Immunology*. 2006;**18**(11):1591-1602. DOI: 10.1093/intimm/dxl092
- [115] Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;**26**(27):4410-4417. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.0284
- [116] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;**29**(15):1949-1955. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.5037

IntechOpen



Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis

L. Sánchez-Hernández^a, L. Montero^a, R. Mojica-Espinosa^b, J.P. Reyes-Grajeda^b,
J. Cervantes-Torres^a, R.M. Parkhouse^c, G. Fragoso^a, E. Sciotto^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, CDMX, CP 14610, Mexico

^c Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156, Oeiras, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

GK-1
Adjuvant
Macrophages
Gene expression
Phagocytosis

ABSTRACT

Purpose: The synthetic peptide GK-1 potentiates protective immunity elicited by the influenza vaccine in mice. In order to understand its adjuvant properties, this study was designed to determine the impact of GK-1 on gene expression and phagocytosis of peritoneal macrophages (PMA).

Methods: Increased gene expression of chemokines involved in leukocyte recruitment and of pro-inflammatory mediators was detected by microarray analysis of control and GK-1 treated PMA macrophages. The expression profile was subsequently confirmed by Multiplex Immunoassays analysis to measure cytokines levels, flow cytometer to describe M1/M2 surface markers and an assay to evaluate their phagocytic activity.

Results: Treatment of PMA with GK-1 results in development to the classically activated M1 functional macrophage subpopulation with increased expression of the CCL3 and CXCL02 chemokines, IL-6 and TNF- α proinflammatory cytokines with a concomitant increase in the levels of NO, accompanied by the expression of modulatory factors that downregulate the inflammatory phenotype. GK-1 treated PMA significantly increased their phagocytic activity.

Conclusion: GK-1 classical activated with enhanced phagocytic capacity may underlie in the increased specific immunity induced when concomitant administered with other antigens.

1. Introduction

Despite the clear positive impact of vaccination on global protection against infectious diseases, there are an estimated 44 million cases of life threatening diseases occurring in 219 nations. The development of new tools to improve vaccine efficiency is one realistic alternative to deal with the magnitude of this task. Indeed, a better understanding of the relevance of innate immunity in controlling the acquired immune response offers rational approaches for immunomodulation in order to improve the limited efficiency and undesirable effects of the available adjuvants [1].

Adjuvants may act at different levels of the immune system. Depending on their biochemical nature, they can selectively inhibit or enhance the functional differentiation of the different cell populations comprising the immune system (i.e. lymphocytes, neutrophils, NK killer cells, dendritic cells and macrophages) [1,2]. Between them,

macrophages play a pivotal role in activating and directing both innate and acquired immunity through their variable cytokine responses to different modes of antigen presentation. These, together with cytokines and chemokines secreted by other cells early in the innate immune response, not only affect monocytes at sites of infection, but also create the cytokine “milieu” that guides the differentiation of monocytes to macrophages and similarly dictates the functional activities of existing macrophages. Their high functional heterogeneity and plasticity highlights macrophages and monocytes as a pivotal target for modulation by adjuvants.

Two major macrophage phenotypes derived from monocytes have been operationally defined, the classically activated M1 and the alternatively activated M2 macrophages. The M1 cells are induced by IFN γ and/or TNF α or bacterial lipopolysaccharide (LPS) and have the following properties: the killing of intracellular parasites and tumor cells, the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, the

Abbreviations: CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl-ester; FDR, False discovery rate; LPS, Lipopolysaccharide; IP-10, Interferon Gamma-Induced Protein 10; MIG, Monokine induced by gamma interferon; MIP-1, Macrophage Inflammatory Proteins

* Corresponding author.

E-mail address: edda@unam.mx (E. Sciotto).

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.010>

Received 3 May 2018; Received in revised form 10 August 2018; Accepted 18 October 2018

Available online 14 November 2018

0165-2478/ © 2018 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

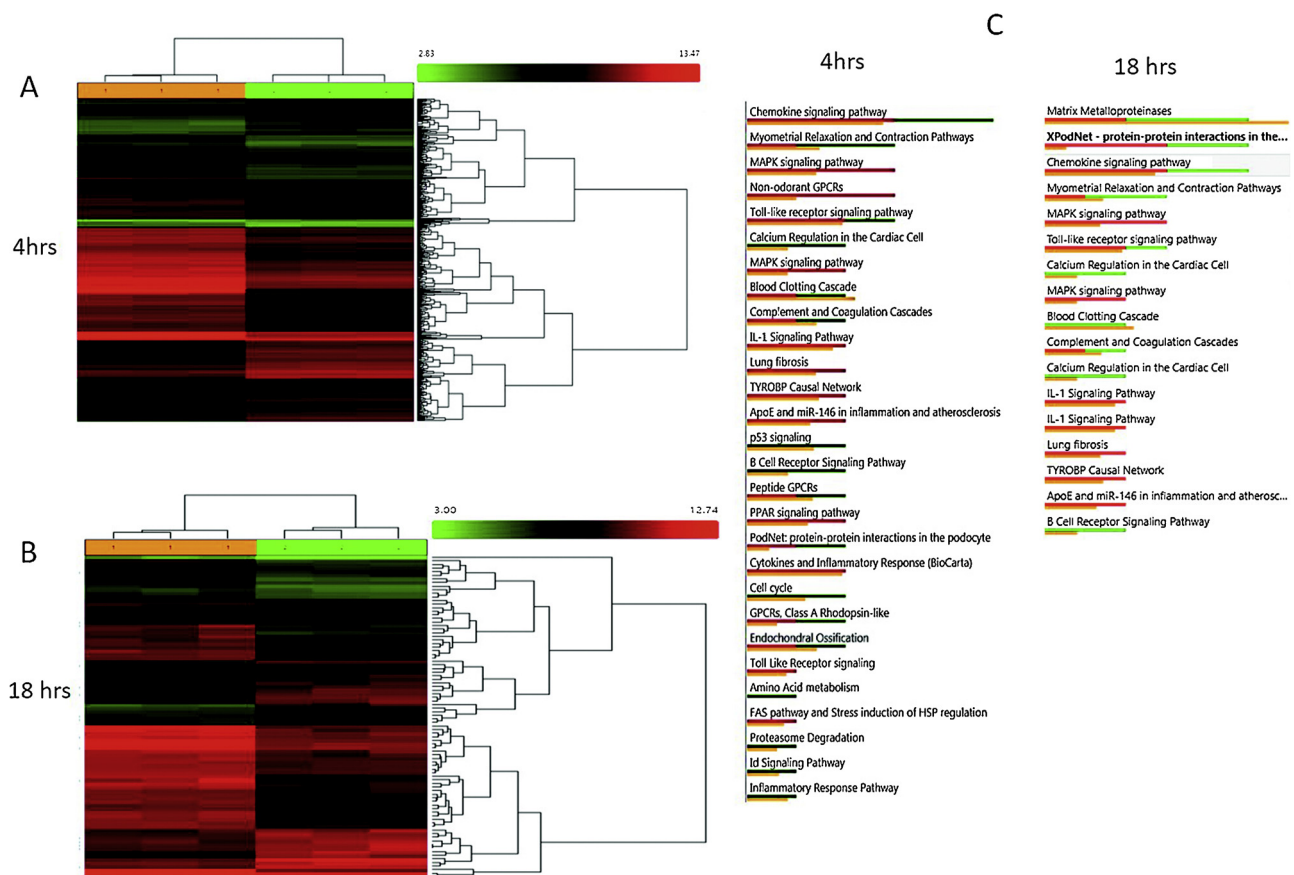


Fig. 1. Gene expression profiling of PMA treated with GK-1. Unsupervised hierarchical clustering of transcriptional profiles (fold-change > 2.0), displayed as a heat map of log-transformed expression values, from CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages of mice untreated or after 4 (A) and 18 h (B) treatment with GK-1. The top ten pathways differentially induced by GK-1 and derived from enrichment analysis are presented as the green bars, and the red bars represent the genes differentially down-regulated by GK-1. The yellow bars represent the statistically important changes induced by GK-1 compared with the control at 4 h (C) and 18 h (D). The analysis was done using Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software. Data are representative of three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

production of nitric oxide (NO), an increased expression of MHC class II, CD80, CD86 molecules, and antigen presentation associated with Th1 cells [3,4]. In contrast, the M2 alternative activated macrophages are involved in the resolution of inflammation and tissue homeostasis and have been further subdivided into at least three different overlapping sub-phenotypes (M2a, b, c), a classification which will almost certainly be revised, given more information; for example, it has been observed that the phenotype of macrophages activated through IL-4 overlap partially with those induced by IL-13, IL-10, TGF β and glucocorticoids [5,6]. Similarly, human monocytes differentiated to macrophages in the presence of IL12 and IL18 are distinct from either M1 or M2 phenotypes [7].

Peritoneal macrophages, cells generated and matured within the body in a dynamic compartment as the peritoneum offer an accurate tool to study *ex vivo*, the effect of GK-1 [8]. In this study, therefore, we focus on the impact of GK-1 on murine peritoneal macrophages. This peptide, belongs to the *Taenia crassiceps* cysticercus recombinant protein KETc7 [9] and has being shown to enhance the protection induced by human influenza vaccine in both young and old mice [10,11]. In addition, GK-1 used as adjuvant provided some degree of protection against experimental murine melanoma and mammary cancers [12]. Perhaps relevant to its adjuvant properties GK-1 promoted the activation of dendritic cells, increasing the expression of CD80/86, MHC class II, and the secretion of IFN- γ , TNF- α , and CCL2 (MCP-1), resulting in an increase in CD4 + T cell proliferation [10,13]. Considering that the plasticity of macrophages can result in awake the adaptative immunity, we extend our studies evaluating GK-1 effect on *in vivo* matured

peritoneal macrophages towards the identification of other possible players that may underlie GK-1 adjuvant properties.

2. Materials and methods

2.1. Mice

BALB/cAnN female mice 6–8 weeks-old were used. Stocks were originally purchased from Charles River, USA, and produced in a pathogen-free facility at our Institute. Food and water were allowed *ad libitum*. All housing and experimental procedures were conducted under the guidelines established by the Committee on the Care and Use of Experimental Animals of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBM) at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Mouse experimentation protocols were approved by the animal safety committee of the IBM, UNAM, and manipulated following to the 'Principles of Laboratory Animal Care' (NIH publication #85-23, revised in 1985). Mice were anesthetized with sevoflurane by inhalation (ABBOTT USA.) before being sacrificed by cervical dislocation.

2.2. Isolation of peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages (PMA) were harvested from the peritoneum of BALB/cAnN mice by IP lavage with PBS. Cells were placed in a 15 mm plates at 2.5×10^6 per 2 ml of RPMI medium 1640 (Gibco BRL, USA) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco BRL, USA) and 1% antibiotics solution (100 units/ml of penicillin, 100 mg/

Table 1
List of top 50 genes up-regulated by GK-1, 4 h and 18 h, in mouse PMA.

Gene symbol	Description	Fold change (up regulated) (GK-1 4 h vs. control 4 h)	Fold change (up regulated) (GK-1 18 h vs. control 18 h)
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	39.11	
^a Il1b	interleukin 1 beta	25.46	2.91
Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e		7.59
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	19.78	
Ifi205	interferon activated gene 205	14.61	
^a Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	14.44	2.94
Mir155	microRNA 155	12.39	
Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	11.22	
Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	9.69	
Tnf	tumor necrosis factor	9.19	
Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	7.28	
Rab11fip1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	6.87	6.82
Marco	macrophage receptor with collagenous structure		
Fpr1	formyl peptide receptor 1		6.55
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	6.48	
H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2		6.33
Il1a	interleukin 1 alpha	5.45	2.27
Jak2	Janus kinase 2	4.99	
Ptges	prostaglandin E synthase	4.81	2.97
Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	4.79	
^a Il6	interleukin 6	4.45	
Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, zeta	4.42	
Lcn2	lipocalin 2	4.36	6.77
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	4.3	
^a Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	4.11	
Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	4.11	
Cd40	CD40 antigen	4.1	
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13		4.03
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial		3.9
^a Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	3.84	
C3	complement component 3		3.82
Clec4a1	C-type lectin domain family 4, member a1		3.42
Irg1	immunoresponsive gene 1	3.79	7.1
Osgin2	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2	3.73	
Nfib	nuclear factor I/B	3.67	
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	3.47	
Lox	lysyl oxidase	3.47	
Nfkbib	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, beta	3.4	
Il12b	interleukin 12b	3.19	
Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha	3.15	
Ifrd1	interferon-related developmental regulator 1	3.02	
^a H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	2.99	
Nfib	nuclear factor I/B	2.92	
Il18	interleukin 18	2.85	
Cd38	CD38 antigen	2.81	
Irf1	interferon regulatory factor 1	2.81	3.36
Icam1	intercellular adhesion molecule 1	2.78	
Cdc42ep2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	2.72	
Tlr2	toll-like receptor 2		2.76
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1		2.7
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	2.69	
Irak3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3		2.66
Il17ra	interleukin 17 receptor A	2.66	
Traf5	TNF receptor-associated factor 5	2.62	
Cd69	CD69 antigen	2.62	
Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	2.58	
Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100	2.56	
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	2.52	
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2.52	
Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105	2.45	
Cav1	caveolin 1, caveolae protein	2.41	
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	2.4	
Siglece	sialic acid binding Ig-like lectin E		2.23

^a Confirmed expression of mediators of inflammation by immunoassay and/or flow cytometer.

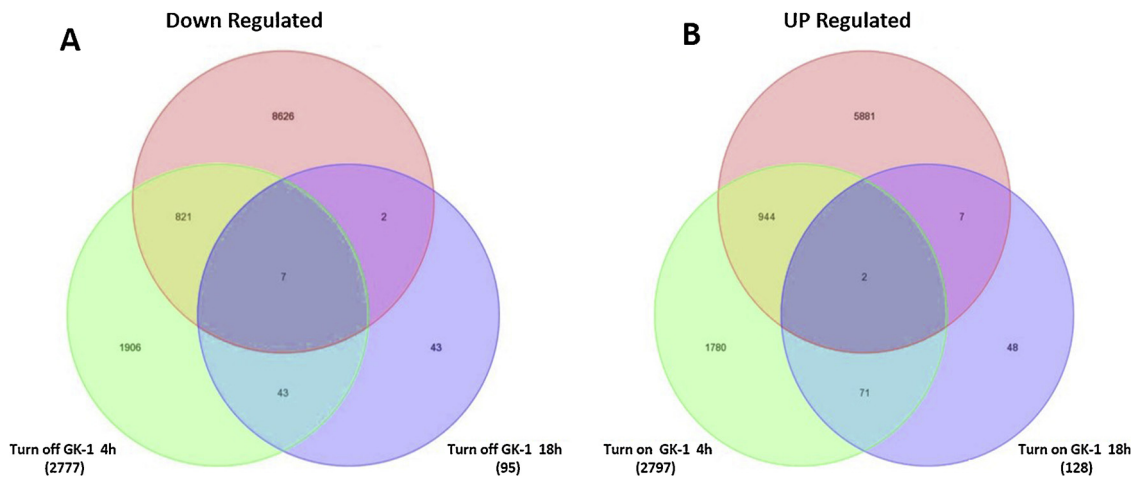


Fig. 2. Identification of gene expression changes specifically associated with the time of treatment. Venn diagram of down-regulated (A) and up-regulated (B) genes contrasting the treatments of 4 h vs18 h, in CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages, taking into account the genes inherent in the controls: Red circles are the controls, green circles are treatment with GK-1 at 4 h and purple circles are treatment with GK-1 at 18 h. The number of genes in each part is shown in parentheses and the genes that cross-link between the conditions are shown inside the circles. Fold-change (FC) ≥ 2 , $P < 0.05$ with FDR, diff > 100 for microarray data. FC-rank plots of genes detected as differentially between 4- and 18 h. The data is representative of 3 independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

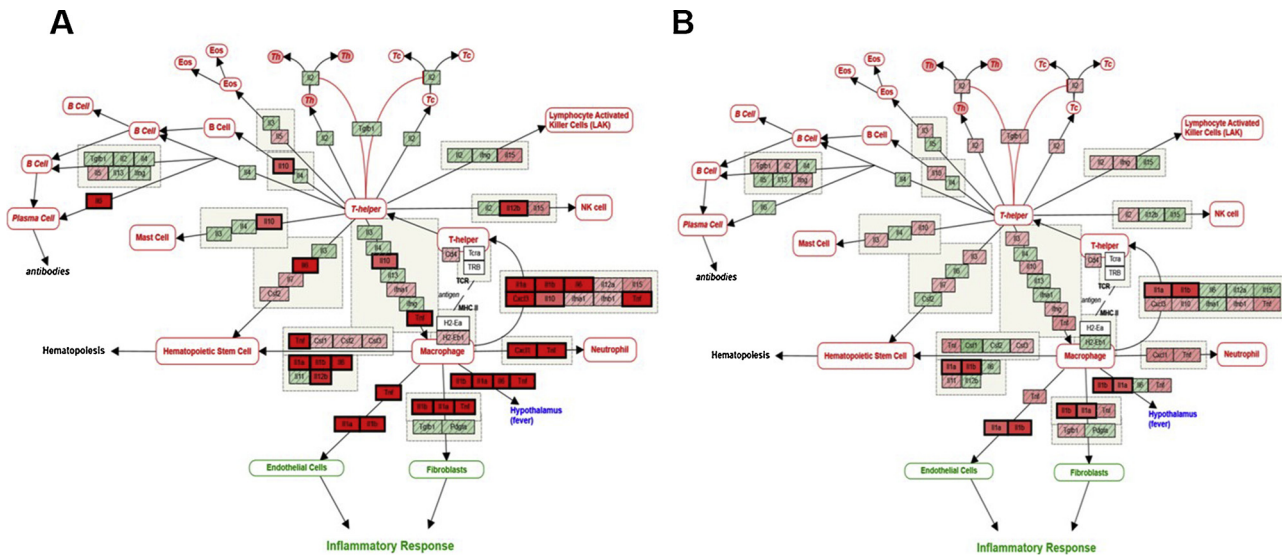


Fig. 3. Network analysis defines stimulus-associated programs of macrophage activation. Pathway representation network of transcriptional regulation of mediators of inflammation 4 h (A) and 18 h (B) after treatment CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages with GK-1 (FC > 2.0) identified by microarray analysis using Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software. The data are representative of 3 independent experiments.

ml of streptomycin (Gibco BRL, USA). Adherent cells were harvested from the plates after 2 h of culture, using cold 1X PBS buffer at 4 °C for 3 to 5 min and then scraping them off using a rubber policeman.

2.3. Peptides

GK-1 was purchased as a synthetic 18-aa peptide (GYYPSPDNTF-YAPPYSA) from USV, LTD, Mumbai, Maharashtra, India (batch RD0001). The peptide was 95% pure as determined by high pressure liquid chromatography using a reverse-phase C₁₈ column. A non-related peptide (NP) from random sequence (STLSPGSSTYTSYTTL) was employed as a negative control.

2.4. Treatment of peritoneal macrophages

PMA were cultured either in complete supplemented medium with GK-1 (10 μg), or as negative controls without the peptide or with the

non-related (NP) peptide (10 μg) described above. Cells cultured with LPS (5 ng/ml, Sigma-Aldrich) served as a positive control.

Further experiments were conducted with PMA cells treated with recombinant mouse IFN γ (5 ng/ml Biologend) or IL-4 (5 ng/ml Biologend) for 24, 48 and 72 h to polarize macrophages to the M1 or M2 phenotype, respectively [14]. The supernatants of all cultures were harvested for cytokine analysis and the cells were washed once prior to surface staining and subsequent flow cytometry.

2.5. Gene expression induced by GK-1

For evaluation of gene expression, we used the Affymetrix mouse GeneChip MouseGene 1.0.s.t microarray containing the complete transcriptome of *Mus musculus*. RNA was extracted from 2.5×10^5 peritoneal macrophages treated with GK-1 at 4, and 18 h. A non-related peptide (NP) was used as a negative unspecific control in the experiments to evaluate nitric oxide. In other experiments (microarrays, flow

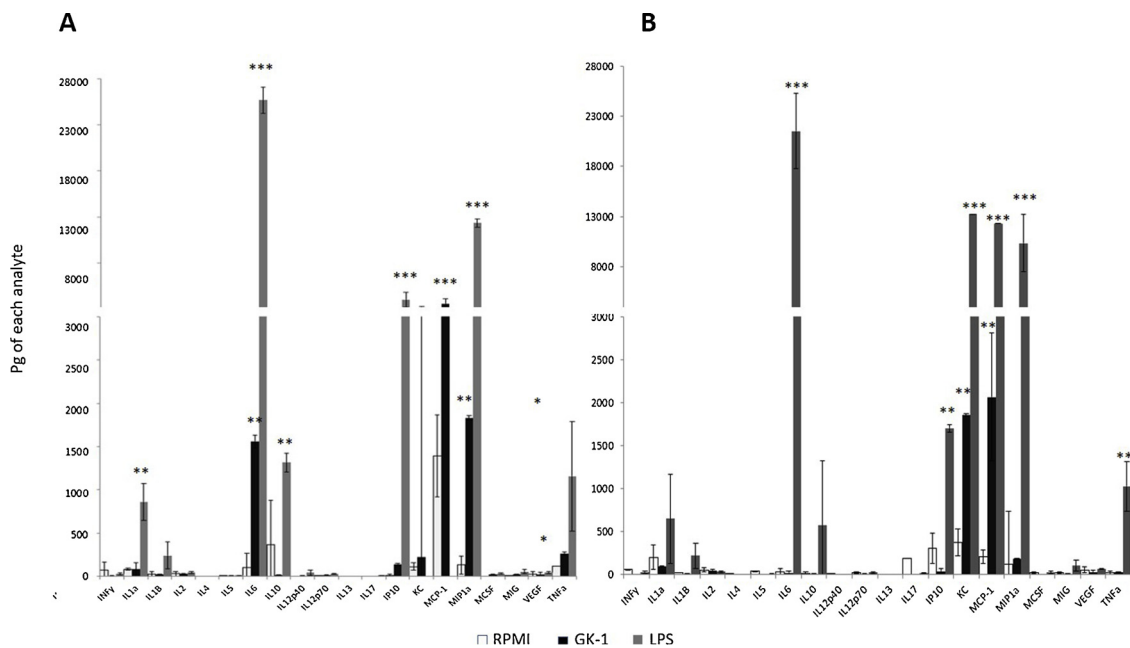


Fig. 4. GK-1 induces the secretion of proinflammatory mediators by PMA. Profile of inflammation mediators produced by CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages stimulated in vitro with GK-1 (A: 18 h; B: 72 h, dark gray bars). Positive control LPS (gray bars). Mock conditions RPMI (white bars). GK-1 induced a statistically significant increase in MCP-1, MIP1 α , IL-6, and TNF- α at 18 h (A) and in KC and MIP1 α at 72 h (B) using the ANOVA test. †Mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005.

cytometry and phagocytosis) RPMI without peptide served as negative control. RNA extraction was performed using RNeasy plus mini kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Concentrations of RNA samples were quantified using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher) and the sample were stored at -70°C . The quality of the RNA was assessed in an Agilent 2100 Bioanalyzer system prior to subsequent hybridization to the Affymetrix GeneChip MouseGene 1.0 st, following the standard Affymetrix protocol.

From the microarray dataset, the changes in normalized gene expression intensities was analyzed and compared. Genes considered to be differentially expressed between the treated and untreated samples were categorized when their change was greater than or equal to 2-fold. The statistical parameter used to define significant change (P) was less than 0.001, and the difference between signal intensities compared to a given gene was over 200. The gene expression analysis was focused on genes related to macrophage activation, the immune response and relevant inflammatory processes.

Pairwise comparisons were performed between GK-1-stimulated cells and control non-stimulated cells in order to determine the number of genes significantly induced by the GK-1 stimulation and the relative fold changes of these genes. To do this, the two-class unpaired analysis was employed with a false discovery rate (FDR) with a cut-off of 1% and the condition that genes must have at least a two-fold change. This stringent FDR cut-off was chosen in order to focus on genes most highly induced or repressed by each condition. We treated the two time points, independently to identify genes that were consistently up or down-regulated after 4 and 18 h of co-culture.

2.6. Gene expression analysis by PCR

A PCR was performed to evaluate the expression of the Nos2 gene that was found up-regulated in PMA co-cultured with GK-1. Total RNA was prepared as described above, and the cDNA synthesis was performed with a Gibco kit according to the manufacturer's instructions.

2.7. Analysis of secreted inflammatory mediators

The cytokine levels for activated macrophages (M1) IL-12, IL-1 β , IL-6, and TNF- α and for (M2) IL-10, IL-4, TGF- β were measured in the supernatants of cultured macrophages following the protocol provided by the commercial Kit of 20 analytes (MILLIPLEX[®]). Concentrations were given in pg/ml of cultured macrophage supernatants using the Luminex Magpix (Xponent Software) system. The commercial panel of 20 analytes (Magnetic Mouse Cytokine 20-Plex Panel) included Basic FGF, IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-6, IL-12, IL-17, MIP-1, GM-CSF, MCP-1, IL-5, VEGF, IL-1, IFN- γ , TNF α , IL-2, IP-10, MIG, KC, and IL-4.

2.8. Macrophage activation membrane markers

Single cell suspensions of peritoneal macrophages treated with GK-1 or with a Non-related peptide (negative control) or with LPS (positive control), with or without IFN γ or IL-4 (activating M1 and M2 stimulants, respectively) were first treated with 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ of anti-mouse FcR antibody (CD16/CD32 BioLegend) for 30 min at 4°C in order to "block" Fc receptors, and then surface stained with antibodies to CD11b, CD80, CD86, MHC-II, CD206, CD36 antibodies (BioLegend). Appropriate isotype controls were always included. Finally, cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS and processed using a FACSCalibur flow cytometer and the Cell-Quest Pro software.

2.9. Nitric oxide

Nitrite is the primary and nonvolatile breakdown product of NO degradation. Thus, NO production was assessed in the supernatants of the macrophages cultured under the different treatments tested using the Griess reagent (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. Briefly, the supernatants were mixed with an equal volume of the Griess reagent. Nitrite concentrations were determined by comparison with standard solution of NaNO₃. The plate was analyzed at 540 nm or in range from 520 to 550 nm by the fluorometry method to determine free oxygen radicals.

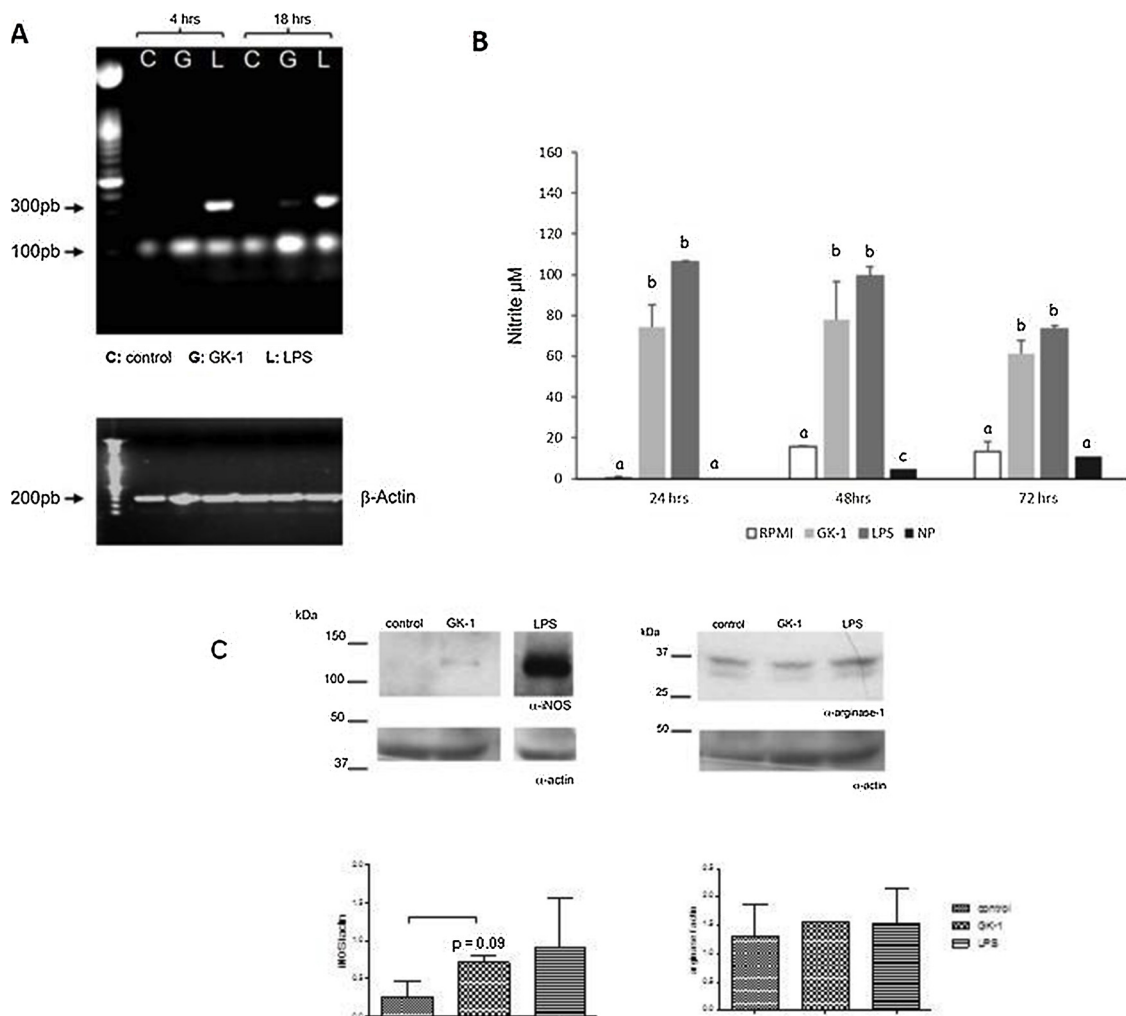


Fig. 5. GK-1 induces the overexpression of iNOS and the synthesis of NO by PMA. A) RT-PCR for iNOS and actin expression of macrophages culture in RPMI alone or with GK1 or LPD. B) Quantification using the ANOVA test of NO synthesis by CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages stimulated by GK1 (light grey bar) or LPS (grey bar) for 24, 48 and 72 h in vitro. There was no significant increase in NO in cultures incubated with non-related-peptide (black grey bar) or under “mock” stimulation (white bar). †Mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005. C) Western Blot for iNOS and arginase-1 expression in peritoneal macrophages cultured with GK1, LPS, or RPMI alone for 72 h. The graph to the right shows the mean ± SD of three independent experiments.

2.10. Immunoblotting

Macrophages previously stimulated with either GK-1 or LPS for 72 h were lysed for 10 min in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 5 mM EDTA supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium fluoride), on ice. Protein concentration was determined by the Lowry method [15]. Lysates were snap-frozen and stored at -80°C . Equal amounts of protein lysates were resolved by gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon®, Millipore). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% milk or BSA-TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Membranes were probed overnight for SOD2 (A-2) [sc-133134] (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); β -actin [ab8229] (Abcam); iNOS [GTX130182], Arginase-1 [GTX634200] (Genetex). On the next day, membranes were washed with 1x TBST for three times and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted in 5% milk or TBST for 1 h at room temperature. Bound antibodies were detected by the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific).

2.11. Phagocytosis assay

Phagocytosis assay was performed by co-incubation of PMA with fluorescently-labeled *Saccharomyces cerevisiae* for 120 min at 37°C at 1:5 ratio in the presence of absence of BALB/cAn inactivated mouse serum. Yeasts were stained with CFSE (10 mM) (carboxyfluorescein succinimidyl-ester) following the procedure previously described. After incubation, the yeasts cells were centrifuged (5 min, $800\times g$), and washed with PBS X3. Yeasts were heat-inactivated at 60°C for 20 min. A total of 2×10^6 yeasts per well was incubated with 5×10^5 macrophages previously cultured with or without GK-1 (30 min, 37°C) in Chamber Slides (Nunc Lab-Tek™). The macrophages were stained for 10 min with the vital dye FM4-64 (Invitrogen™) in order to have contrast with the yeasts. The cells were washed three times with PBS at room temperature, counterstained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Phagocytosis of fluorescent yeasts was measured by confocal microscopy (Nikon A1R + STORM) and by epifluorescence microscopy (Nikon Labophot) 2 by counting the number of macrophages with more than three yeasts in a total of 500 cells in three independent experiments.

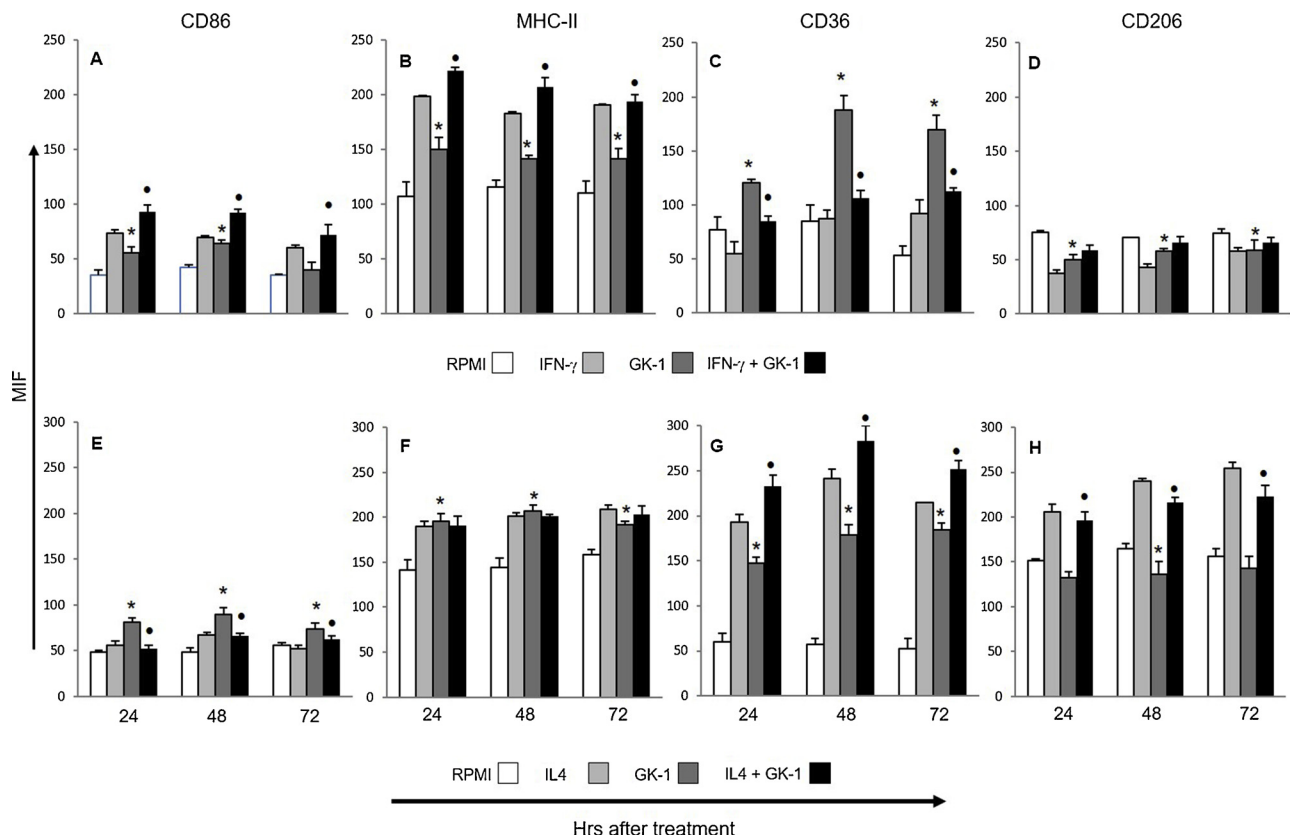


Fig. 6. GK-1 increases the expression of membrane-associated activation markers in PMA. Mean \pm SD of the median fluorescence intensity. In vitro-treatment of CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages with GK-1 significantly increases the expression of CD86 (A) at 24, 48 and 72 h, MHCII (B) at 24, 48 h, CD36 (C) at 48, 72 h and CD206 (D) at 72 h. Synergistic effect of GK-1/IFN- γ or GK-1/IL-4 treatment on expression of PMA surface membrane markers. Cells were treated with GK-1 and IFN- γ or GK-1 and IL-4 and the cell surface expression of CD86, MHCII, CD36 and CD206 was evaluated by cell surface staining and FACS. Combined treatment of GK-1 / IFN- γ (dark gray), GK-1 (gray), IFN- γ (light gray), and the mock conditions (white), are shown in A to D. Similarly, after treatment with GK-1 / IL-4 (dark gray), GK-1 (gray), IL-4 (light gray), and the mock conditions (RPMI, white), are presented in E to H. All treatments were for 24, 48 and 72 h. The values represent the mean Medium Fluorescence Intensity (MFI) of three different experiments. The data are mean \pm SD. The statistical analysis was done using the Kruskal-Wallis test. †Mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005.

2.12. Statistical analysis

The statistical analysis of the inflammatory mediators and the expression of membrane phenotypes was performed with PRISM Version 5.0 software. All analyses were performed in three independent experiments. Quantitative data were presented as mean \pm S.D. and compared using ANOVA test. A P-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. GK-1 induced differential gene expression of peritoneal macrophages

A detailed transcriptional profile of peritoneal macrophages treated with GK-1 at 4 h at 18 h was subjected to gene expression profiling analysis with whole genome microarrays (Fig. 1A, B). Unsupervised hierarchical clustering analysis showed a differential expression between control and GK-1 treated macrophages that allowed us to perform the comparison between the heat-maps resulting from each exposure time of 4 and 18 h to GK-1.

Of the total of 28,944 genes included in the microarray, 503 were differentially expressed by cells treated with GK-1 for four h. Of these, 312 genes were up-regulated and 191 were down-regulated. A lower number of genes (90) remained differentially expressed 18 h after treatment, with 61 genes being up-regulated and 29 down-regulated (Table 1).

3.2. Identification of genes specifically associated with the time of treatment

A summary of genes that are differentially up or down regulated, with a fold-change > 1.0 at different times is presented in Venn diagrams constructed with Partner Illuminates microarray program (Fig. 2 A and B). Comparing at 4 and 18 h after treatment with GK-1, 2797 genes were up-regulated and 2777 were down-regulated, with 40% approximately of the genes implicated in immune-inflammatory responses.

3.3. Network analysis defines stimulus-associated programs of PMA activation

Treatment of GK-1 resulted in increased and/or decreased differential expression of genes involved in pro-inflammatory mediators. In Fig. 3 we present a summary of transcriptional regulation of mediators of inflammation at 4 and 18 h after treatment with GK-1.

These changes were grouped into clusters of key genes regulating inflammatory pathways, for example, interleukins and chemokines signal pathways. Four hours after treatment there was an increased expression of genes that code for cytokines such as IL-12 β , IL-6, IL-1 α , IL10, IL-1 β , TNF- α and for chemokines such as CXCL1, CXCL2 and CXCL3 (Fig. 3A). Some of these (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-10, CXCL1 and CXCL3) continued to be overexpressed 18 h later together, with the overexpression of some additional cytokines (IL15 and TGF- β) (Fig. 3B).

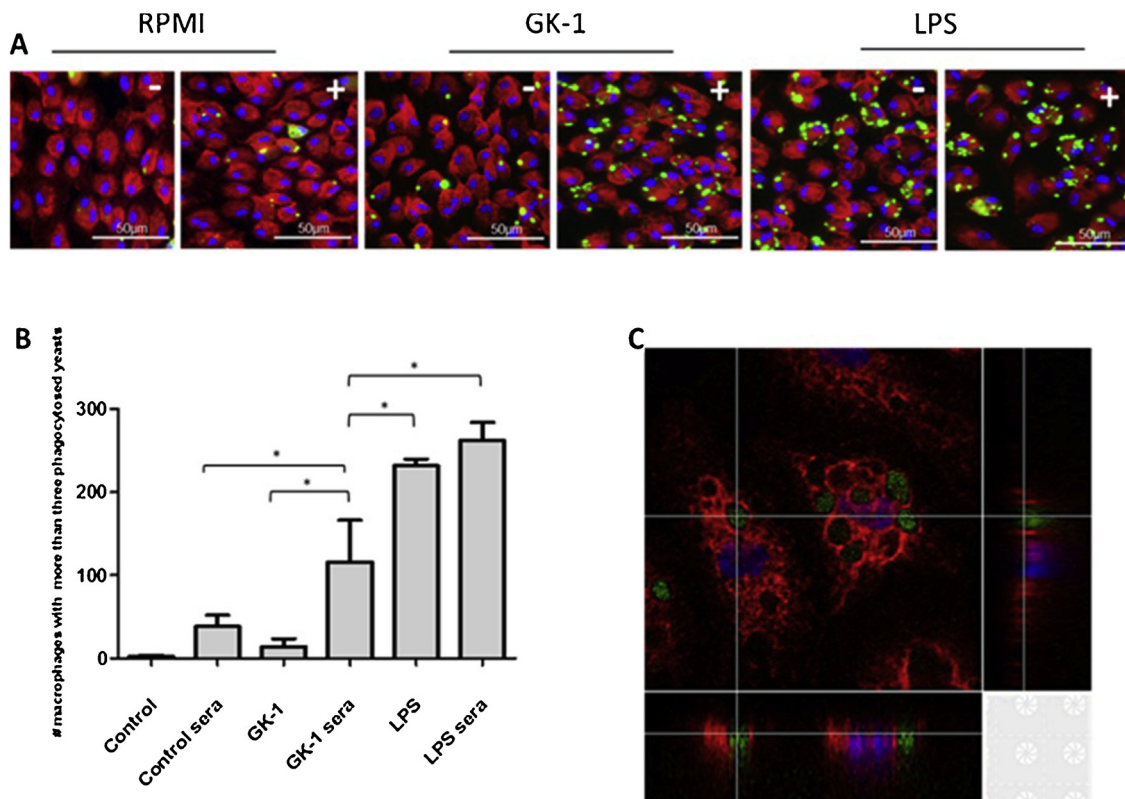


Fig. 7. Increased phagocytosis in PMA cultured with GK-1. CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages were cultivated for 24 h with GK-1 and then cultured 30 min with *S. cerevisiae* labeled with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (green label) in medium containing either inactivated or complete mouse sera. Thereafter, macrophages were stained with FM4-64 (red) and a nuclear marker DAPI (blue). Merged images (A) of cells treated with media, GK-1 or LPS without or with BALB/cAnN inactivated mouse serum. The phagocytosed yeasts were quantified by counting 500 macrophages in triplicate per condition in each experiment. B. Mean \pm SD of the number of macrophages with three or more yeasts of three independent experiments. *Significantly different at $P < 0.05$ using the ANOVA test. C: A 3D image z stacks in confocal microscopy that demonstrates the internalization of yeasts by macrophages. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. GK-1 induces the expression of pro-inflammatory mediators and NO in PMA

To confirm the microarray results, the level of inflammatory mediators was measured in the supernatants of control and GK-1 stimulated macrophages. PMA cultured with GK-1 secreted significantly increased levels of IL-6, TNF- α , IP-10 (CXCL10), Mip-1 α (CCL3) and MCP-1 (CCL2), compared to control cultures. Similarly, high levels of IL-1 β , IL-12, IL-6, CXCL10, CCL3, CCL2 and TNF- α were detected in the supernatants of LPS-treated macrophages (Fig. 4).

Importantly, GK1 induced a very small increase in iNOS expression after 4 h of culture, which slightly increased 18 h later (Fig. 5A), as reflected by an increase in NO production by macrophages stimulated for 24 h with GK-1. This increase in NO was maintained at 48 h but decreased at 72 h. A similar trend was observed in the LPS stimulated cultures, in contrast to the low level of NO in the un-treated cultures (Fig. 5B). To evaluate whether the decrease in NO levels at later times was associated with the polarization of M1 macrophages towards a M2 phenotype, both iNOS and arginase-1 expression were determined at 72 h of culture. As shown in Fig. 5C, iNOS expression remained slightly increased, but arginase-1 expression levels were not different from those in control macrophage cultures, which constitutively expressed this enzyme.

3.5. Changes in PMA surface markers induced by GK-1

Peritoneal macrophages cultured with GK-1, were evaluated for their expression of surface markers by FACS analysis, specifically, CD69, CD40, CD80, CD86, MHCII (M1), CD36 and CD206 (M2). Expression of

CD86, MHC-II and CD36 was significantly increased at 24 h in PMA stimulated with GK-1 and remained increased up to 72 h for MHC-II and CD36 (Fig. 6A–D), consistent with an M1 macrophage phenotype. In contrast, the M2 marker CD206 was expressed at low levels at 24 h by GK1 stimulated macrophages compared to cells cultured with medium. There were no significant differences in the expression of CD69, CD40 and CD80 found at any time (data not shown).

Stimulation of PMA with IFN- γ plus GK-1 resulted in significantly increased expression of CD86 and MHC-II compared to GK-1 alone after 24 h, but not after 72 h (Fig. 6A). In comparison with control cultures, incubation with IFN and GK-1 resulted in a moderately low expression of CD36 (Fig. 6C), but once again no effect was observed in the expression of CD206 (Fig. 6D).

When PMA were treated with IL-4/GK-1 (Fig. 6E–H), there was an increased expression of CD36 and CD206 at 24, 48 and 72 h compared to GK-1 alone (Fig. 6G,H). As expected IFN- γ induced a high expression of CD86 and MHC-II from 24 to 72 h (Fig. 6A, B), together with a reduced expression of CD36 and CD206 (Fig. 6C, D) (except for CD36 at 72 h, where an increase was observed, Fig. 6C). Finally, IL4 induced a considerably high expression of CD36 and CD206 (Fig. 6G, H), a discrete increase of MHC-II (Fig. 6F), but no impact on the expression of CD86 was observed (Fig. 6E).

3.6. SOD2 gene expression

It is very well known that the oxidative stress that accompanies NO production is a signal of danger to the cells. Since one of the main antioxidant enzymes whose genes were overexpressed in peritoneal macrophages cultured with GK1 was superoxide dismutase 2 (SOD2),

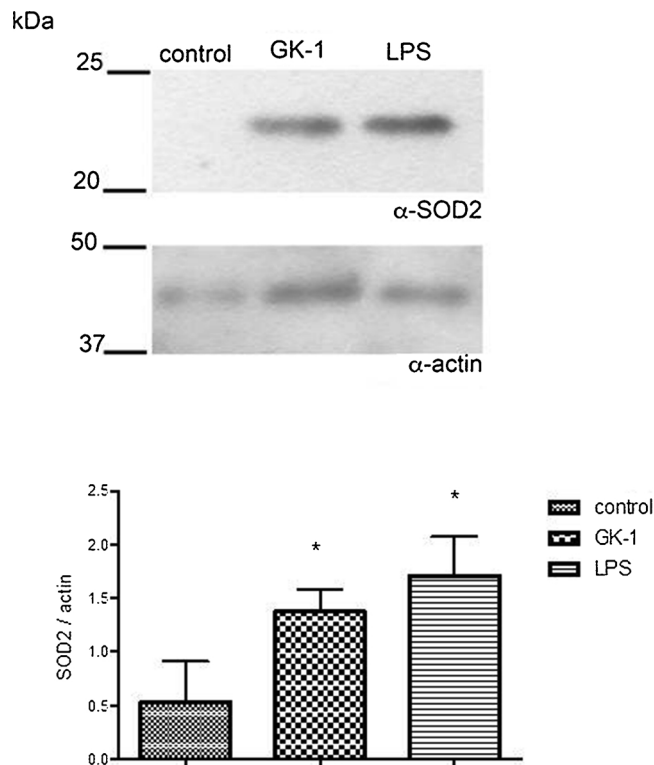


Fig. 8. Western Blot for SOD-2 expression in peritoneal macrophages cultured with GK1, LPS, or RPMI alone for 72 h. The graph shows the mean \pm SD of three independent experiments.

we probed the effectivity of GK1 in inducing its production. As shown in Fig. 8, both LPS and GK1 induced an overexpression of the SOD2 protein.

3.7. GK-1 increased phagocytosis activity of PMA in vitro

To evaluate the functional effects of GK-1 on cultured macrophages a phagocytosis assay was employed. The level of phagocytosis in PMA cultured with the fluorescent yeast and GK-1 was significantly increased when an inactivated serum was added (Fig. 7A–C).

4. Discussion

Macrophages play a key role in tissue homeostasis, inflammation, immunity, and disease pathogenesis. The wide spectrum of macrophage activities is reflected in an equally complex range of functionally distinct populations differentiated from monocytes according to the prevailing cytokine “milieu”, created as a result of the early inflammatory response to a pathogen.

Historically, those macrophages differentiated in the presence of $IFN\gamma$, LPS, or GM-CSF were defined as the M1 inflammatory population, whereas those differentiated in the presence of IL-4, IL-13, or M-CSF were defined as the M2 anti-inflammatory population [5,14]. Now, however, it is clear that there is a wide spectrum of functional macrophage subpopulations, and a more rational classification based on gene expression profiles is now in progress [16]. Moreover, macrophages display a remarkable phenotypic plasticity, i.e. they are able to change, their functional phenotypes according to varying environmental stimuli [5,14]. Thus, macrophages and their progenitors, the monocytes, are key cells in the interconnecting pathways that lead to the induction of an acquired response, thereby providing a rational basis for the development of novel adjuvants.

This work is aimed to understand the immunomodulatory activities of the highly stable synthetic GK-1 peptide [24], specifically, 1) its

proven utility as an adjuvant for immunization with the influenza vaccine [10,13], its significant antitumoral effect on 4T1 mouse mammary carcinoma [12]. Here, therefore, and considering the important role of macrophages in immunomodulation, we present our findings on the impact of GK-1 on the function and gene and cell surface marker expression of peritoneal macrophages.

The differential impact of GK-1 on gene expression profiles was analyzed through hierarchically clustered profiles related to inflammatory processes such as Toll-like receptor (TLR2) (Fig. 3 and Table 1). Our results showed an overexpression of genes encoding for M1 macrophage classical markers (IL1 β , TNF α , IL6, IL12 β) and a down-regulation of genes encoding for M2 markers (Arg1) in GK-1-treated macrophages [17]. Recently, a study analyzing transcriptional mRNA profiling data identified other markers for the M1 phenotype (CD38, Gpr18, Fpr2) [5] and, interestingly, the microarray assay also showed a GK-1 peptide induced expression of CD38, Fpr2, CCL2, and CCL7.

The observed increased expression of the transcript for TLR2 in GK1 treated cells may indicate an involvement of GK-1 in TLR2 activation, a possibility consistent with the observed and concomitant up-regulation of NF- κ B, the major downstream target of TLR2 signaling [18]. This, in turn, could predict an increased production of inflammatory cytokines (i.e. IL1, IL6, TNF α) and chemokines (MIP-1alpha, MCP1, etc.) as well as inducible enzymes such as COX-2 and iNOS [19]. Significantly therefore, an increase in most of these cytokines and chemokines was confirmed by multiplex gene expression analysis. In addition, GK-1-treated peritoneal macrophages produced NO and overexpressed the CD86 co-receptor and MHC-II. GK-1 treated macrophages also produced increased levels of iNOS (Fig. 5A and C) and NO (Fig. 2B), which can be involved in increasing phagocytic activity in macrophages (Fig. 7). Interestingly, GK-1 reduced the effect of the oxidative response by overexpressing SOD2 (Fig. 8), an essential mitochondrial antioxidant enzyme that can restore macrophage homeostasis.

After 72 h of GK-1 treatment, however, the cells had largely lost the M1 phenotype and exhibited an increased expression of CD36, indicating a shift towards an alternatively activated M2 phenotype perhaps as a strategy to control possible adverse inflammatory reactions. In relation to this possibility, when peritoneal macrophages were treated with GK-1 plus IL-4, there was a synergistic increase of the CD36 receptor, reinforcing the idea that GK-1 might interact with the CD36 receptor [20]. Also, it should be noted that peritoneal macrophages cultured in RPMI medium alone showed a constitutive expression of arginase-1, an enzyme that competes with iNOS for arginine and whose expression was not modified when macrophages were incubated with GK1. Being arginase-1 a classical M2 enzyme, its preponderance over iNOS after 72 h of culture with GK1 could help to shift the M1 phenotype to an M2 one [19].

Another result that merits comment is the synergistic effect induced by GK-1 and $INF\gamma$ in promoting the polarization of the peritoneal cells toward the M1 phenotype, as evidenced by the increased expression of CD86 and MHCII. Finally, GK-1 treatment resulted in a decreased expression of the M2 marker CD206 by IL-4 stimulated cells.

Macrophages are professional phagocytes, playing a central role in tissue maintenance and host defense, first by engulfing and killing pathogens [21], and second through their subsequent role as antigen presenting cells. Phagocytosis, therefore, is regarded as an indicator of macrophage activity [22] representing the first essential step for the immunological defense system and a rational target for adjuvants. Thus, the observed stimulation of phagocytosis by GK-1, and the concomitant increased expression of the CD38, Rab11fip1, and Hli-MII genes, may favor antigenic presentation and contribute to the adjuvant properties of GK-1 [23].

In conclusion, this study demonstrates that GK-1 promotes significant phenotypic changes in peritoneal macrophages, including the polarization to the M1-classical phenotype and an increased phagocytic activity, both phenomena that may underlie its demonstrated adjuvant effects.

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT project No. 253891 and the Program of Research for the Development and Optimization of Vaccines, Immunomodulators and Diagnostic Methods of the Biomedical Research Institute from National Autonomous University of Mexico (UNAM).

References

- [1] J. Bayry, Regulatory T cells as adjuvant target for enhancing the viral disease vaccine efficacy, *Virus Dis.* 25 (2014) 18–25.
- [2] A. Fernández, L. Oliver, L.E. Álvarez, K.P. Lee, C. Mesa, Adjuvants and myeloid-derived suppressor cells: enemies or allies in therapeutic cancer vaccination, *Hum. Vaccin. Immunother.* 10 (2014) 3251–3256.
- [3] S. Gordon, P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 953–964.
- [4] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677–686.
- [5] S.A. Amici, J. Dong, A.M. Guerau, Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia, *Front. Immunol.* 10 (2017) 1–18.
- [6] D.M. Mosser, The many faces of macrophage activation, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 209–212.
- [7] L. Darwich, G. Coma, R. Peña, R. Bellido, E.J.J. Blanco, J.A. Este, M. Bofill, Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18, *Immunology* 126 (2009) 386–393.
- [8] A. Cassado A dos, M.R. D'Império, K.R. Bortoluci, Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function, *Front. Immunol.* 19 (2015) 1–9.
- [9] K. Manoutcharian, G. Rosas, M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, E. Sciotto, Cisticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens, *J. Parasitol.* 82 (1996) 250–254.
- [10] V.R. Segura, T.A. Pérez, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, F. Rosetti, G. Fragoso, S. Grinstein, E. Sciotto, A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine, *Vaccine* 20 (2006) 1073–1080.
- [11] G. Fragoso, G.F. Esquivel, M.A. Santana, R.J. Bobes, B. Hernández, J. Cervantes, R. Segura, F.A. Goldbaum, E. Sciotto, G. Rosas, Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity, *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (2011) 1067–1076.
- [12] D. Torres-García, A. Perez-Torres, K. Manoutcharian, U. Orbe, R. Servin-Blanco, G. Fragoso, E. Sciotto, GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model, *Vaccine* 35 (2017) 5653–5661.
- [13] V.R. Segura, G. Fragoso, E. Sciotto, A. Sarukhan, Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK-1 on the immunogenicity of an influenza vaccine, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1338–1343.
- [14] F.O. Martínez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation, *F1000Prime Rep.* 6 (2014) 1–13.
- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (1951) 265–275.
- [16] C. Porta, E. Riboldia, A. Lppolitoa, A. Sica, Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation, *Semin. Immunol.* 27 (2015) 237–248.
- [17] C. Porta, M. Rimoldi, G. Raes, L. Brys, P. Ghezzi, D. Liberto, F. Dieli, S. Ghisletti, G. Natoli, P. De Baetselier, A. Mantovani, A. Sica, Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa β , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 14978–14983.
- [18] Y. Liu, Y. Wang, M. Yamakuchi, S. Isowaki, E. Nagata, Y. Kanmura, I. Kitajima, I. Maruyama, Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa β activation, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2788–2796.
- [19] M. Triantafilou, F.G. Gamper, R.M. Haston, M.A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung, K. Triantafilou, Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting, *J. Biol. Chem.* 13 (2006) 31002–31011.
- [20] H.T. Aung, K. Schroder, S.R. Himes, K. Brion, W. van Zuylen, A. Trieu, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, D.A. Hume, M.J. Sweet, T. Ravasi, LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression, *FASEB J.* 20 (Jul (9)) (2006) 1315–1327.
- [21] J.W. Kang, F.T. Nguyen, N. Lue, R.R. Dasari, D.A. Heller, Measuring uptake dynamics of multiple identifiable carbon nanotube species via high-speed confocal Raman imaging of live cells, *Nano Lett.* 12 (2012) 6170–6174.
- [22] C.Y. Lai, D.P. Strange, T.A.S. Wong, A.T. Lehrer, S. Verma, Ebola virus glycoprotein induces an innate immune response in vivo via TLR4, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1571.
- [23] J. Cervantes-Torres, R. Segura-Velázquez, P. Padilla, E. Sciotto, G. Fragoso, High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 5 (2017) 97–102.



Lisandro Sánchez Hernandez PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants.



Laura Montero Leon PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants

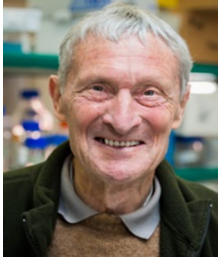


Raúl Mojica Espinosa MSc. Ascription: Subdirection of development of clinical applications Position: Head of Department in Medical Area B National Institute of Genomic Medicine of Mexico



Juan Pablo Reyes Grajeda PhD. PhD. Biomedical sciences National Autonomous University of Mexico, UNAM Associate Researcher in the Medical Proteomics Unit National Institute of Genomic Medicine of Mexico Work areas Expert in the purification and biochemical characterization of proteins, as well as in crystallogensis and crystallography.

Jacquelynne Cervantes Torres PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants, expert in vitro and in vivo testing of several biological molecules involved in cell differentiation and activation.



Michael Parkhouse PhD. Biochemistry University of London, United Kingdom (UK) Researcher of the Department of Infections & Immunity Gulbenkian Institute of Science Work areas Infectious organism and its host



Edda Lydia Sciutto Conde PhD. Researcher of Department of Immunology Biomedical Research Institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Immunoparasitology. Neuroinflammation. Identification of antigens and protective epitopes against cysticercosis. Diagnosis of human and porcine cysticercosis Development of adjuvants



Gladis Fragoso Gonzalez PhD. Researcher of Department of Immunology Biomedical Research Institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Immunoparasitology. Neuroinflammation Identification of antigens and protective epitopes against cysticercosis. Diagnosis of human and porcine cysticercosis Development of adjuvants



The helminth-derived peptide GK-1 induces an anti-tumoral CD8 T cell response associated with downregulation of the PD-1/PD-L1 pathway



Noé Rodríguez-Rodríguez^{a,b}, Iris K. Madera-Salcedo^a, Emmanuel Bugarin-Estrada^a, Elizabeth Sánchez-Miranda^a, Diana Torres-García^b, Jacquelynne Cervantes-Torres^b, Gladis Fragoso^b, Florencia Rosetti^a, José C. Crispín^{a,*}, Edda Sciotto^{b,**}

^a Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
CD8 T cell
GK-1
Melanoma
PD-1

ABSTRACT

CD8 T cells can kill malignant cells in an antigen-specific manner. However, anti-tumoral responses are usually limited by suppressive factors that curb the effector responses of tumor-infiltrating CD8 T cells. Therapeutic strategies to overcome intra-tumoral T cell suppression, for example immune checkpoint inhibition, have been clinically effective in patients with cancer. Here, we provide data that demonstrates that GK-1, a peptide derived from the parasite *Taenia crassiceps*, promotes an anti-melanoma CD8 T cell response with heightened effector characteristics that leads to an increased amount of tumor-infiltrating CD44⁺ IFN- γ -producing CD8 T cells. The response induced by GK-1 was associated with a reduction in the expression of PD-1 and PD-L1 on tumor-infiltrating CD8 and dendritic cells, respectively, effects that led to a dramatic decrease in tumor burden. Our results suggest that the immunomodulatory properties of GK-1 may promote a CD8 T cell response that may be therapeutically useful in the setting of cancer.

1. Introduction

The clinical success of immune checkpoint inhibitors (ICI) in patients with cancer has demonstrated that the immune system is capable of eliminating tumors, but fails to do so because its effector capacities are actively hampered by peripheral tolerance mechanisms [1]. Tumor cells generate a microenvironment that fosters immunosuppression and protects them from the cytotoxic activities of NK and CD8 T cells that become neutralized upon entering the tumor [2]. A deeper understanding of the mechanisms that underlie tumor-mediated cytotoxic cell inactivation and the identification of therapeutic strategies to overcome those mechanisms is currently an area of intense research.

GK-1 is an 18 amino-acid peptide derived from the helminth *Taenia crassiceps* [3]. GK-1 demonstrated immune-modulating properties when co-administered as an adjuvant with the human influenza vaccine [4]. In that setting, GK-1 significantly improved the protection conferred by the vaccine. This effect was associated with increased titers of anti-influenza IgG and increased mononuclear cell infiltration into the lung

parenchyma [4]. Higher dendritic cell (DC) expression of MHC-II and co-stimulatory molecules, along with increased secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g. IFN- γ , TNF- γ , and MCP-1) were associated with GK-1 administration [5].

The capacity of GK-1 to boost the immune system was further evaluated in a murine model of melanoma [6]. Peri-tumoral injection of the peptide was associated with a significant reduction in tumor growth and an increase in overall survival (42.58%). Pathological analyses demonstrated that treatment with GK-1 increased the area of necrosis in the tumors, suggesting that it enhanced the anti-tumoral cytotoxic response [6,7]. The capacity of GK-1 to improve survival and reduce metastasis was also observed in a breast cancer model in Balb/c mice, where GK-1 promoted IL-12 production within the tumor micro-environment [7].

The aim of this work was to determine the mechanisms through which GK-1 enhances the immune response in the context of melanoma. To this end, we analyzed the effects of GK-1 administration in tumor-infiltrating DCs and antigen-specific CD8 T cells, in order to identify the

* Correspondence to: Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Mexico City 14080, Mexico.

** Correspondence to: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Mexico City 04510, Mexico.

E-mail addresses: carlos.crispina@incmnsz.mx (J.C. Crispín), edda@unam.mx (E. Sciotto).

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.07.006>

Received 25 March 2019; Received in revised form 4 July 2019; Accepted 8 July 2019

Available online 09 July 2019

1521-6616/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

molecules involved in the immunomodulatory function of the peptide.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mice between 6 and 12 weeks of age were used. C57BL/6 mice were provided by the Unit for Biological Models of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). CD45.1 and OT-II mice were a gift from Dr. Gloria Soldevila (IIB, UNAM). $Rag1^{-/-}$ (B6.129S7- $Rag1^{tm1Mom/J}$), and OT-I (C57BL/6-Tg(Tcr α Trcb)1100Mjb/J) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Maine, USA). Only female mice were used in these experiments. Animals were euthanized if the tumor area reached 400 mm². All procedures were approved and performed according to the guidelines of the Institutional Committee for the Husbandry and Use of Laboratory Animals.

2.2. B16-F10/OVA cell line

The B16-F10/OVA melanoma tumor cell line expressing the model antigen Ovalbumin (OVA) was a gift from Dr. Laura Bonifaz (Instituto Mexicano del Seguro Social). Cells were grown in DMEM with 10% FCS (Gibco) and 100 U/mL of penicillin and streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. Cells were detached by gentle shaking in 0.05% Trypsin-EDTA (ThermoFisher) for up to 2 min, washed in ice-cold PBS, counted, and resuspended in PBS at a concentration of 2×10^6 cells/mL. For injections, 2×10^5 cells were subcutaneously inoculated in the shaved right flank of mice.

2.3. GK-1 administration

GK-1 was synthesized, tested endotoxin-free, and stored as a dry powder. For use, GK-1 was dissolved in sterile saline at 1 mg/mL. Ovalbumin (Sigma, OVA) was dissolved in saline 1 mg/mL and sterile-filtered. Saline, 100 µg of GK-1, or 100 µg of GK-1 plus 100 µg of OVA were inoculated intravenously (i.v) by tail vein injection in a total volume of 200 µL.

2.4. T cell adoptive transfer

Spleen and peripheral lymph nodes (pLN, axillary and inguinal) from CD45.1 OT-I or CD45.1 OT-II mice were harvested and strained into RPMI with 2% FCS through a 70 µm cell strainer. Red blood cells were lysed and CD8 or CD4 T cells were isolated using MACS CD8 α^+ or CD4 $^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), respectively, according to the manufacturer's instructions. Lymphocytes were resuspended at 1×10^7 cells/mL in sterile PBS. Cells were i.v. injected into the tail vein of recipient mice one day prior to tumor cell implantation.

2.5. Tissue processing and flow cytometry

Spleen and tumor-draining lymph nodes were collected and strained throughout a 50 µm cell strainer. Tumors were collected and weighted. Tumor tissue was thoroughly chopped with a razor blade and incubated at 37 °C under 200 rpm agitation in RPMI with 2% FCS containing 1 mg/mL of Collagenase Type IV (Gibco) and 20 U/mL of DNase I (Sigma), before being disaggregated through a 70 µm cell strainer. Cells were incubated with red blood lysis buffer and resuspended in PBS with 2% FCS for flow cytometry staining. Cells were counted using a hemocytometer and a BD Accuri™ C6 cytometer.

For Flow cytometry analysis, cells were stained with GhostDye (Tonbo Biosciences) for 15 min in PBS at 4 °C, washed and stained in 50 µL of PBS with 2% FCS for 30 min. For intracellular staining, the eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining buffer was used. To measure IFN- γ production by antigen-specific cells, cell suspensions

were incubated with OT-I or OT-II cognate-antigen specific peptides (GenScript, 1 µg/mL) overnight with the addition of Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) for the last 6 h. Antibodies against mouse TCRV α 2 (B20.1), TCRV β 5.1/5.1 (MR9-4), CTLA-4 (UC10-4B9), FoxP3 (150D), CD80 (16-10A1), CD86 (GL-1), PD-L1 (10F.9G2), PD-1 (29F.1A12), CD11c (N418), I-A/I-E (M5/114.15.2), H-2Kb bound to SIINFEKL (25-D1.16), and CD44 (IM7) were from Biolegend. Anti-mouse CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD8 α (53-5.7), CD4 (GK1.5/RM4-5), CD62L (MEL-14), CD25 (PC61.5) IFN- γ (XMG1.2) were from Tonbo Biosciences. Anti-Ki67 (Sola15) was from eBioscience.

2.6. Statistical analyses

Data were analyzed using Graphpad Prism and expressed as mean \pm SEM. Statistical significance between groups was determined using unpaired Student's *t*-test or ANOVA followed by Tukey post-test. Welch's correction was applied when required. $p < .05$ was considered significant.

3. Results

3.1. GK-1 enhances the anti-tumoral capacities of CD8 T cells

Previous work by our group and others has shown that GK-1 administration reduces the growth of tumors in murine models of breast cancer and melanoma [7,8]. However, the mechanisms that underlie the anti-tumoral effect of GK-1 remain poorly understood. To determine whether GK-1 exerts its effects in a T cell-dependent manner, we administered GK-1 (100 g/week) to mice with B16-F10/OVA melanoma (Fig. 1A). In accordance to previous findings [8], GK-1 administration was associated with a significant reduction in tumor growth at day 21 post-inoculation (Fig. 1B). In contrast, when the recipient mice lacked T cells ($Rag1^{-/-}$), GK-1 administration had no effect on tumor growth (Fig. 1C).

To evaluate whether GK-1 enhanced the anti-tumor capacities of antigen-specific CD8 T cells, we adoptively transferred CD45.1 OT-I CD8 $^+$ T cells into congenic CD45.2 C57BL/6 mice and inoculated them with an ovalbumin (OVA)-expressing melanoma (B16-F10/OVA). Mice received vehicle, GK-1, or GK-1 plus OVA every week (Fig. 1D). As shown in Fig. 1E, administration of GK-1 and GK-1 plus OVA was associated with a highly significant reduction in tumor weight and incidence (Fig. 1F). These results indicate that GK-1 ameliorates the growth of melanoma through an effect on CD8 T cells.

3.2. GK-1 unleashes the effector function of CD8 T cells

In order to better understand the anti-tumor effects of GK-1, we quantified the number of infiltrating antigen-specific CD8 T cells in the tumors of mice treated with GK-1, GK-1 plus OVA, and vehicle. As shown in Fig. 2A, the number of tumor-infiltrating OT-I cells was similar between groups and was not affected by GK-1. However, when we analyzed the phenotype of the infiltrating OT-I cells, we noticed that a higher percentage of cells expressed markers associated with the effector memory subset in the mice treated with GK-1 or GK-1 plus OVA (Fig. 2B), indicating that GK-1 promotes the differentiation of tumor-infiltrating effector cells. We performed ex-vivo restimulation with antigen presenting cells (APCs) loaded with the OT-I-specific peptide SIINFEKL and observed that OT-I cells isolated from tumors of mice treated with GK-1 plus OVA expressed more Ki-67, an intracellular protein associated with cell cycle progression and proliferation (Fig. 2C). Treatment with GK-1 also led to a robust enhancement of IFN- γ production. More cells expressed IFN- γ and the content of IFN- γ per cell was increased in mice treated with GK-1 plus OVA (Fig. 2D and E).

The effector capacities of anti-tumor-specific CD8 T cells are regulated by cell-intrinsic mechanisms of peripheral tolerance [1]. Activated CD8 T cells upregulate molecules (e.g. PD-1 and CTLA-4) that make

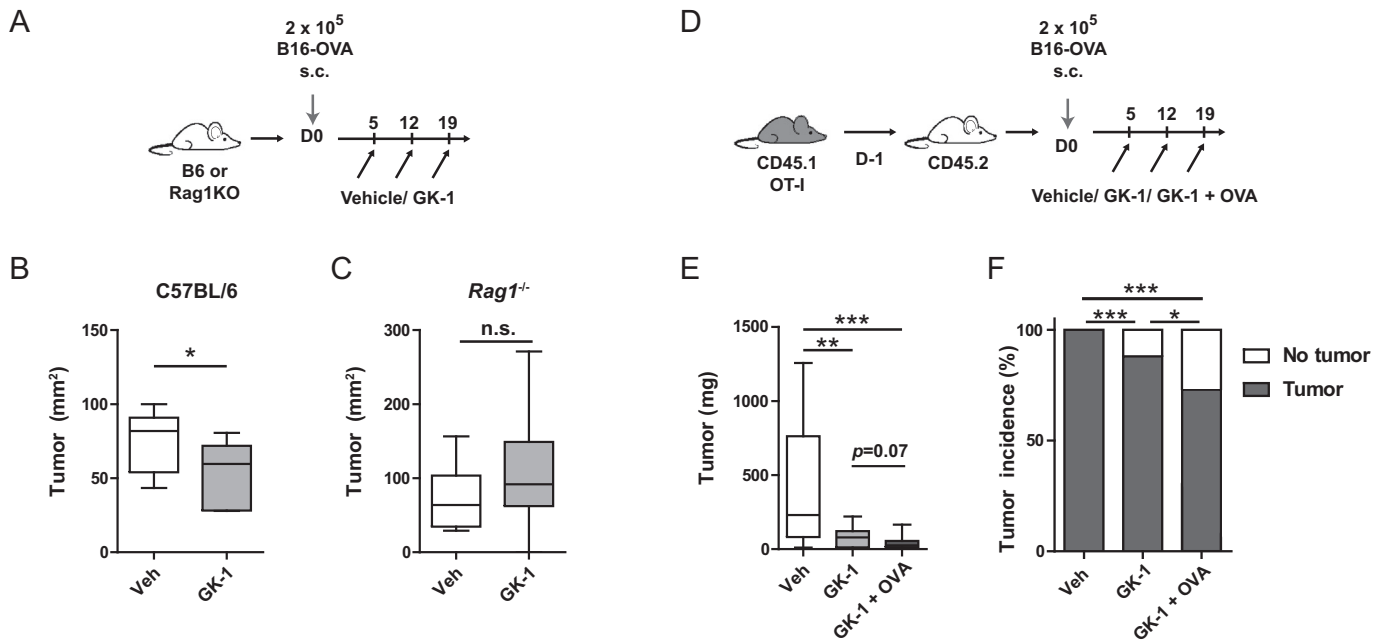


Fig. 1. GK-1 administration suppress tumor growth in a T cell-dependent manner. (A) 2×10^5 B16-OVA melanoma cells were inoculated subcutaneously (s.c.) into C57BL/6 or *Rag1*^{-/-} mice. Saline (Veh) or GK-1 (100 μ g) were administered intravenously (i.v.) once a week. (B) Mice were sacrificed at day 21 and tumor size was determined. Data from one out of two independent experiments ($n = 5$ mice per group, per experiment) are shown. * $p < 0.05$. (C) B16-OVA cells were inoculated into T cell deficient *Rag1*^{-/-} mice. Tumors were measured on day 18. Data from two independent experiments are shown ($n = 6-8$ per group, per experiment). (D) 2×10^6 CD45.1 OT-I CD8 T cells were adoptively transferred (i.v.) into congenic C57BL/6 (CD45.2) mice. The next day, 2×10^5 B16-OVA cells were inoculated (s.c.). Mice received vehicle, GK-1 (100 μ g), or GK-1 + OVA (100 μ g each) weekly. (E) Mice were sacrificed at day 21 and tumor weight was determined. Shown are cumulative data from 4 independent experiments ($n = 9-15$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (F) Tumor incidence in mice from (D). Pooled data from 6 independent experiments are shown ($n = 22-26$ mice per group). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

them susceptible to inhibition by ligands expressed by suppressor cells and tumor cells. The importance of these mechanisms has been recently demonstrated by the use of ICI, biological drugs that interrupt these suppressive processes [1]. In order to determine whether treatment with GK-1 could ameliorate suppression through PD-1 or CTLA-4, we analyzed the expression of these molecules. As shown in Fig. 2F, expression of PD-1 on tumor-infiltrating OT-I cells was significantly reduced by treatment with GK-1 with or without OVA. To determine whether the inhibition of PD-1 expression had a clinically significant effect, we plotted the weight of the tumor against the expression of PD-1 (gMFI). We observed a significant correlation ($r^2 = 0.55$, $p = .001$) between these two variables, suggesting that inhibition of PD-1 expression is directly associated with a better clinical outcome in mice treated with GK-1 (Fig. 2G).

To assess whether other relevant elements of the cellular immune response against melanoma were affected by GK-1, we quantified the expression of CTLA-4 in tumor-infiltrating OT-I cells. Treatment with GK-1 plus OVA was associated with a significant decrease in the expression of this inhibitory molecule (Fig. 2H). Finally, we measured the abundance of regulatory T cells (Tregs; $CD4^+ FoxP3^+ CTLA-4^+$) within tumor-infiltrating lymphocytes. As shown in Fig. 2I, Tregs represented a sizable fraction of tumor-infiltrating $CD4^+$ T cells. GK-1 administration was associated with a modest, but statistically significant reduction in the percentage of tumor-infiltrating Tregs. This effect was not significant in mice treated with GK-1 plus OVA.

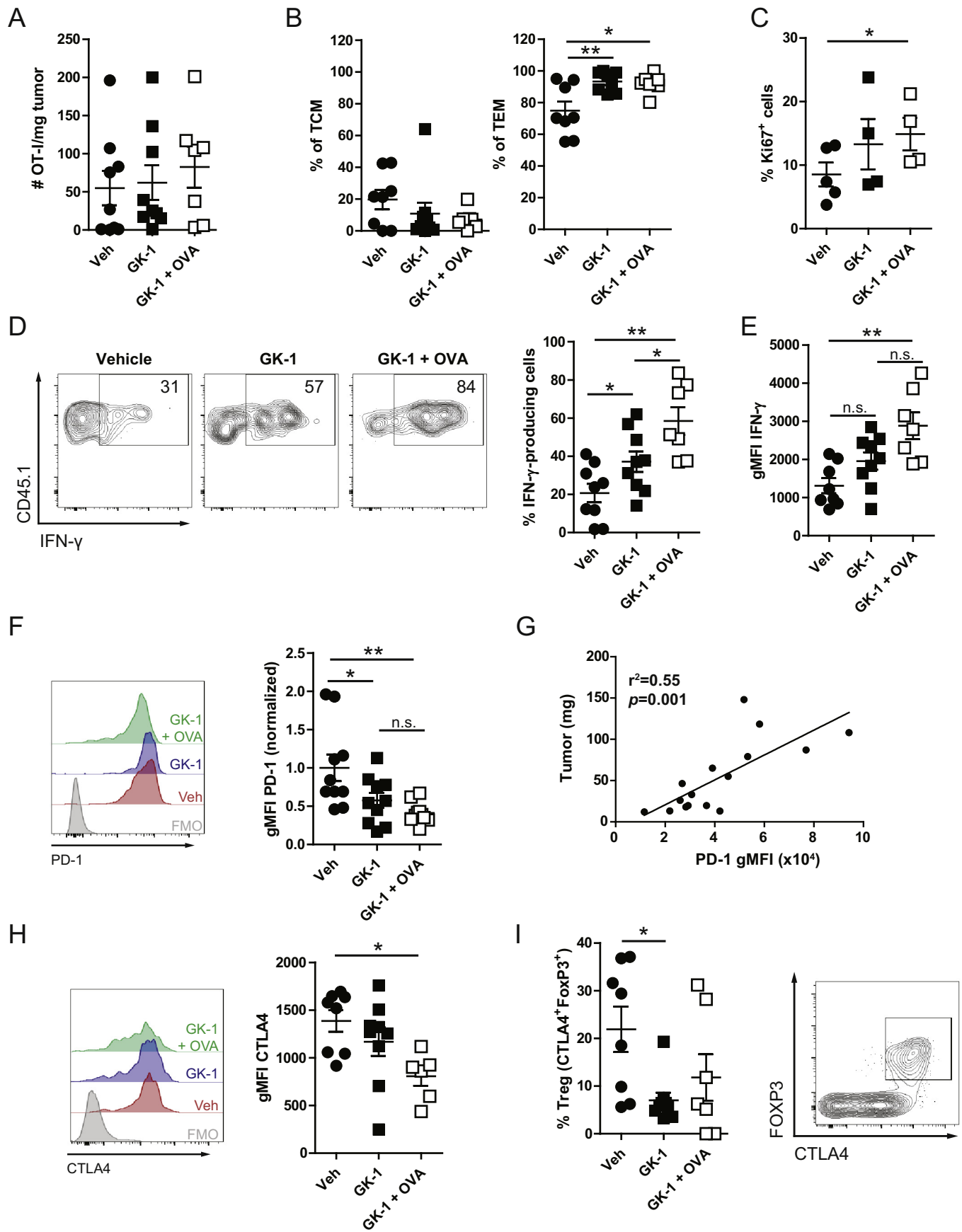
3.3. GK-1 reduces PD-L1 expression on tumor-infiltrating dendritic cells (DCs)

In vitro experiments have shown that GK-1 enhances the pro-inflammatory capacity of murine peritoneal macrophages [9]. Therefore, we hypothesized that the effects exerted by GK-1 on CD8 T cells could result from the activation of local DCs. To this end, we analyzed the

phenotype of DCs from the spleen, draining lymph nodes (dLN) and tumors of control and GK-1-treated mice (Fig. 3). DCs from the spleen and dLN expressed low levels of CD80, CD86, and PD-L1, indicating that most of them were in a resting state (Fig. 3A-C). The expression levels of CD80 and PD-L1 were significantly higher on tumor-infiltrating DCs from control mice (Fig. 3A and B). Whereas expression of CD80 and CD86 was not affected by the immunomodulatory treatment, administration of GK-1 or GK-1 plus OVA was associated with a significant downregulation of PD-L1 expression, specifically in tumor-infiltrating DCs (Fig. 3C). Other parameters, for example the abundance of tumor-infiltrating DCs (defined as live $CD11c^+ I-A/I-E^{hi}$ cells) and the expression of SIINFEKL-loaded class I MHC molecules, were not different in control mice compared to animals treated with GK-1 (Figs. 3D-E).

3.4. GK-1 effects are limited to the tumor microenvironment

When we analyzed the phenotype and function of adoptively transferred OT-I cells obtained from the spleen and dLN of recipient mice, we noticed that the administration of GK-1 or GK-1 plus OVA had different consequences in the cells found in these locations (Fig. 4). The absolute number of OT-I cells was modestly reduced in dLN of mice treated with GK-1 plus OVA, perhaps reflecting different homing capabilities (Figs. 4A). Although the abundance of cells that produced IFN- γ was similar between the three groups of mice, the production of IFN- γ at the single cell level was significantly higher in the group that received GK-1 plus OVA (Fig. 4B and G). Levels of expression of PD-1 (Fig. 4C and H) and CTLA-4 (Fig. 4D and I) were significantly higher in mice treated with GK-1 plus OVA. These data, that apparently contrast with the phenotype of tumor-infiltrating OT-I cells (Fig. 2F and H), are explained by differences in the activation status of the CD8 T cells found infiltrating the tumor. Tumor-infiltrating T cells are highly activated effector cells that express very high levels of PD-1 and CTLA-4. In



(caption on next page)

Fig. 2. GK-1 exhibits adjuvant properties. (A) OT-I CD8 donor T cells (CD45.1⁺CD8⁺Vα2⁺) per mg of tumor. (B) Proportion of central memory (CD62L⁺CD44⁺) and effector memory (CD62L⁻CD44⁺) OT-I cells in tumors. Cumulative data from two independent experiments are shown (*n* = 7–9). (C–E) Proliferation and IFN-γ production by OT-I cells was measured upon ex vivo stimulation with SIINFEKL in the presence of Brefeldin A. (C) Fraction of Ki-67-positive cells within OT-I donor cells. (D) Representative contour plots (left) and cumulative data (right) showing the percentage of OT-I cells that produce IFN-γ. (E) Geometric mean fluorescence intensity (gMFI) of IFN-γ from cells in (D). Data from one (C, *n* = 4–5 mice per group) or two independent experiments is shown (D and E, *n* = 7–9). (F) Expression of PD-1 in donor OT-I tumor infiltrating cells. Representative histograms (left) and cumulative data (right) from 3 independent experiments is shown (*n* = 9–12 mice per group). (G) Correlation between PD-1 expression (gMFI) and tumor weight (mg) in mice treated with GK-1 or GK-1 + OVA. Cumulative data from 2 experiments is shown (*n* = 16). (H) Expression of CTLA-4 in donor OT-I tumor infiltrating cells. Representative histograms (left) and cumulative data (right) from 2 independent experiments is shown (*n* = 7–9 mice per group). (I) Proportion of regulatory T cells (Tregs; FOXP3⁺CTLA4⁺) within tumor-infiltrating endogenous CD4⁺ T cells. Left, cumulative data from two independent experiments; right, gating used to define Tregs. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

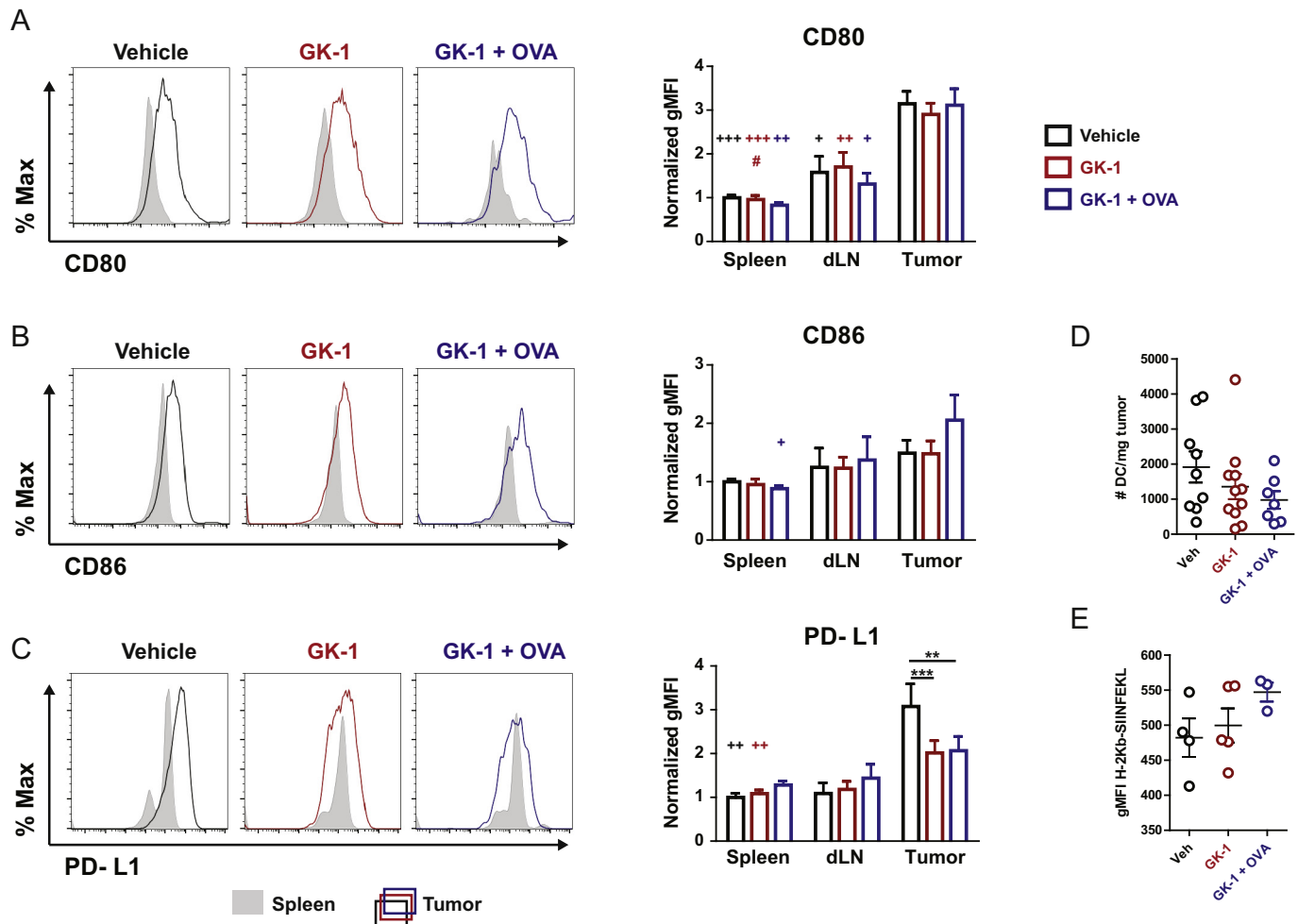


Fig. 3. GK-1 reduces the expression of PD-L1 in tumor-infiltrating dendritic cells. Dendritic cells (DCs; CD11c⁺I-A/I-E^{hi}) from spleens, draining lymph nodes (dLN), and tumor cell suspensions were analyzed. (A–C) Representative histograms from mice that received vehicle, GK-1, or GK-1 + OVA. DCs from the spleen (grey histograms) and tumor (empty histograms) of representative mice are shown (left). Cumulative data from 2 independent experiments (*n* = 9–11 mice per group) are presented in the bar graphs. gMFI was normalized to the mean gMFI of the splenic DCs from mice that received vehicle. +*p* < 0.05 vs. tumor, ++*p* < 0.01 vs. tumor, +++*p* < 0.001 vs. tumor; #*p* < 0.05 vs. dLN (paired *t*-test). (D) Numbers of DCs normalized against tumor weight. (E) Expression levels of MHC-I-SIINFEKL complex on tumor infiltrating DC is shown as gMFI. Results from one experiment is shown (*n* = 3–5 mice per group). ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

contrast, expression of these molecules in dLN and spleens is much lower. The differences observed in dLN and spleens are probably caused by a more robust activation of OT-I cells exposed to exogenously administered OVA. Finally, no differences in the abundance of Tregs were observed between the three groups of mice (Fig. 4E and J).

3.5. GK-1 does not enhance the anti-tumoral capacities of CD4 T cells

To determine whether GK-1 enhances the effector function of CD4 T cells and to assess whether its anti-tumor effects are also mediated through CD4 T cells, we adoptively transferred OVA-specific OT-II cells (CD45.1) into CD45.2 WT mice and inoculated them with B16-F10/

OVA cells. We observed no differences in tumor size or weight between mice that received GK-1, GK-1 plus OVA, or control saline (Fig. 5A). In line with these results, we could not detect OT-II cell infiltration into the tumor (data not shown) and administration of GK-1 or GK-1 plus OVA did not cause a significant expansion of OT-II cells in the spleen or dLN (Fig. 5B). When we analyzed the phenotype of tumor-infiltrating DCs, we found no differences in expression of MHC-I-antigen (Fig. 5C) or in the expression of CD80 and CD86 (Fig. 5D). Interestingly, the reduction in PD-L1 expression observed in mice treated with GK-1 in the presence of CD8 OT-I cells (Fig. 3C), did not occur when the tumor-specific T cells were OT-II (Fig. 5E). These results suggest that, in this system, GK-1 has a negligible effect on CD4 T cell effector functions and

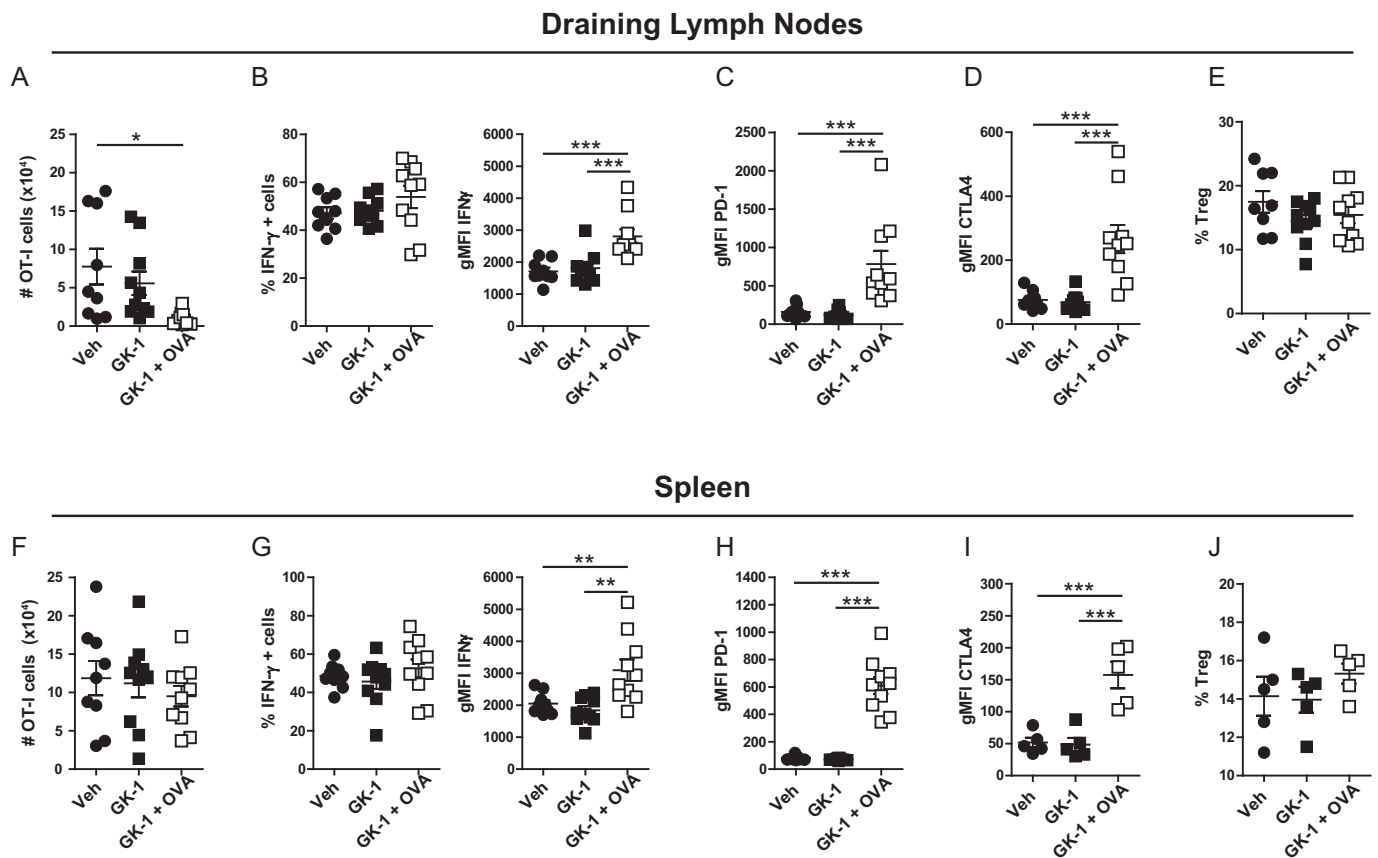


Fig. 4. The effects of GK-1 are limited to the tumor microenvironment. Draining lymph nodes (A-E) and spleen (F-J) were analyzed. (A, F) Number of donor OT-I CD8⁺ T cells. (B, G) Proportion of cells producing (left) and expression (right) of IFN- γ . Expression of PD-1 (C, H) and CTLA4 (D, I) in donor T cells. (E, J) Proportion of Tregs within CD4⁺ cells. Results from two experiments ($n = 9-10$ mice per group), except I and J, with only one experiment ($n = 5$ mice per group). Cumulative data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

even suggest that CD4 T cells may be promoting tolerance to the tumor antigens.

To test this hypothesis, we transferred CD45.1/2 OT-I CD8 T cells in the absence or presence of equal amounts of CD45.1 OT-II CD4 T cells and analyzed the effects of the CD4 T cells on the phenotype of tumor-infiltrating DCs and CD8 T cells. Again, we observed that GK-1 plus OVA administration did not affect CD80 expression, but significantly reduced PD-L1 expression in tumor-infiltrating DCs (Fig. 5F). Surprisingly, the coadministration of tumor-specific OT-II CD4 T cells abrogated the PD-L1 downregulation. When we analyzed the phenotype of OT-I CD8 T cells, we observed an analogous effect: GK-1 plus OVA significantly reduced PD-1 expression, but the presence of CD4 T cells annulled the effect (Fig. 5G). This could not be attributed to differences in the exposure to cognate antigen because the levels of CD44 expression on CD8 T cells were the same in the 3 groups of mice (Fig. 5G).

To determine whether transferred OT-II CD4 T cells were differentiating into regulatory T cells, we analyzed their expression of FoxP3 in spleens, dLN, and tumors. Although we found that ~10% of endogenous CD4 T cells were FoxP3⁺ in the spleen and dLN of GK-1 plus OVA treated mice, and observed variable frequencies of FoxP3⁺ CD4 T cells in the tumors, a very small fraction of the transferred OT-II cells expressed FoxP3 (Fig. 5H) indicating that differentiation into FoxP3 cells was not being induced by GK-1 administration.

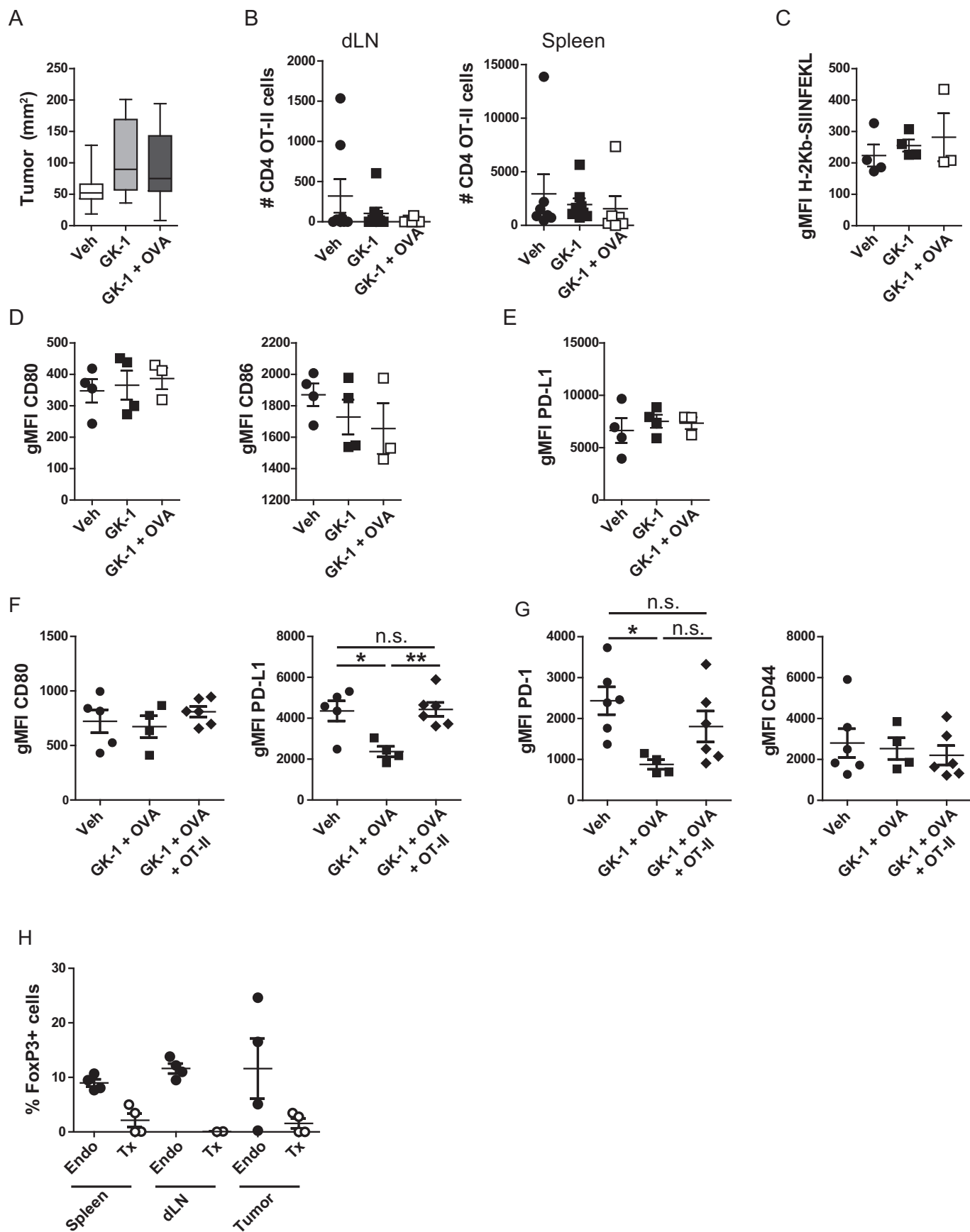
4. Discussion

Here we have analyzed the mechanisms that underlie the anti-tumoral effects of GK-1, a peptide derived from *T. crassiceps*. We show that its effects depend on tumor-specific CD8 T cells and present data

that indicate that their enhanced function is a consequence of decreased PD-1/PD-L1 signaling.

Previous work from our group and others has shown that GK-1 administration to mice with melanoma and breast cancer can reduce tumor burden and increase survival [6–8]. These effects have been proposed to rely on the activation of the immune system because GK-1 has well-recognized effects on immune cells [5,9]. Here, we show that the effects of GK-1 depend on the presence of the adaptive immune system, because they are not observed in *Rag1* deficient animals. Previous work has shown that GK-1 has adjuvant properties [4,5] and can thus activate APCs [9]. The data presented here indicates that following in vivo administration, it strongly inhibits the tumor-induced upregulation of PD-L1 without affecting CD80 and CD86 expression. This effect is mirrored by the abrogation of PD-1 expression by tumor-infiltrating antigen-specific CD8 T cells. As a result, cancer-specific CD8 cells achieve enhanced effector capacities that allow them to attack the melanoma in a clinically significant manner.

We compared the administration of GK-1 alone and with OVA, a model antigen contained in the melanoma and recognized by OT-I cells. The hypothesis was that administration of GK-1 alone could potentiate presentation of tumor-derived antigens through its effects on APCs, but that immunization with OVA (along with GK-1 as an adjuvant) would have stronger effects because it would induce the systemic activation of OT-I CD8 T cells far from the tumor-associated immunosuppressive milieu. Interestingly, both strategies were virtually equivalent. Although we did observe a stronger activation of OT-I cells in primary lymphoid organs (spleen and lymph nodes) in mice treated with GK-1 plus OVA, the clinical effects were modest. This may be related to the fact that the effects of GK-1 were limited to tumor-infiltrating APCs and



(caption on next page)

Fig. 5. GK-1 does not enhance the anti-tumoral capacities of CD4 T cells. (A-E) CD45.1 OT-II CD4 cells were adoptively transferred i.v. into congenic C57BL/6 mice. One day after, 2×10^5 B16-OVA melanoma cells were implanted (s.c.). Mice received vehicle, GK-1 (100 μ g) or GK-1 + OVA (100 μ g each) every 7 days and were euthanized 21 days after the inoculation of the tumor. (A) Tumor size at day 21 ($n = 6-8$ mice per group, two independent experiments). (B) Absolute number of transferred OT-II cells in the draining lymph node (dLN) and spleen. (C-D) Expression of tumor-associated MHC-I-SIINFEKL (C), expression of CD80 and CD86 (D), and expression of PD-L1 (E), on tumor infiltrating DCs. Results representative from one of two experiments ($n = 3-4$ mice per group). (F-H) CD45.1/2 OT-I CD8 cells were adoptively transferred into C57BL/6 mice in the absence or presence of CD45.1 OT-II CD4 T cells. One day after, 2×10^5 B16-OVA melanoma cells were implanted (s.c.). Mice received vehicle or GK-1 + OVA (100 μ g each) every 7 days and were euthanized 21 days after the inoculation of the tumor. (F) CD80 and PD-L1 expression on tumor-infiltrating DCs. (G) PD-1 and CD44 expression on tumor-infiltrating OT-I CD8 T cells. (H) Percentage of FoxP3⁺ cells among transferred CD45.1 OT-II CD4 T cells (Tx) and endogenous CD45.2 CD4 T cells (Endo) in spleens, dLNs, and tumors of mice. Cumulative data expressed as mean \pm SEM. n.s: not significant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

were very modest elsewhere. Thus, its mechanism of action may rely on the modulation of APC function in specific settings, or depend on the crosstalk between CD8 T cells and DCs. For example, production of IL-12, a cytokine critical for the control of anti-tumor responses [10], could be upregulated directly by the effects of GK-1 in DCs and macrophages [7,9,11] and indirectly by the production of IFN- γ by CD8 T cells [12].

An unexpected observation was that OT-II CD4 cells were not found within the tumors and that their presence abrogated the effects of GK-1 on APCs and CD8 T cells. CD4 help is pivotal for productive anti-tumor responses [13,14] and we anticipated that OT-II cell infiltration and effector function would be enhanced by GK-1. The negative effects exerted by CD4 T cells were not caused by differentiation into regulatory T cells and are not concordant with what has been observed in other models [5]. Further work is needed to clarify this issue.

In conclusion, here we provide evidence indicating that GK-1 could serve as an efficient adjuvant for vaccines targeting tumor antigens. Although the link between GK-1 and CD8 T cell activation remains to be completely defined, our results suggest that GK-1 may enhance CD8 T cell effector functions through its effects on DCs. In the future, it would be interesting to compare whether these effects of GK-1 are shared by different adjuvants, in particular, those approved for human therapy. A recent report from our group demonstrated the safety of GK-1 administration [15], paving the road to its eventual use in cancer patients.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.07.006>.

Acknowledgements

We thank Laura Bonifaz from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) for providing the cell line B16-F10/OVA. We thank Gloria Soldevila and Sandra Ortega from the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM, for providing CD45.1 and OT-II mice. We thank Daniel Garzón, Marisela Hernández, and Georgina Díaz (IIB, UNAM) for their help handling our mouse colonies. We thank Damaris Romero and Joaquín Zúñiga from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER, Mexico) for their valuable help with flow cytometry. N.R.R is the recipient of a DGAPA-UNAM fellowship award. This work was supported by grants from CONACYT, Mexico (256752 and 253891), and from DGAPA-PAPIIT (IN213219). It also received support from the Program of Research for the Development and Optimization of Vaccines, Immunomodulators, and Diagnostic Methods of the IIB, UNAM.

References

- [1] D.M. Pardoll, The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 252–264, <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- [2] Y. Yang, Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 3335–3337, <https://doi.org/10.1172/JCI83871>.
- [3] G. Gevorkian, K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernandez, J.C. Almagro, M. Viveros, J. Sotelo, E. Garcia, E. Sciotto, Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis, *Immunol. Lett.* 49 (1996) 185–189 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8739315> (accessed March 13, 2019).
- [4] R. Segura-Velázquez, A. Pérez-Torres, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, F. Rosetti, G. Fragoso, S. Grinstein, E. Sciotto, A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine, *Vaccine* 24 (2006) 1073–1080, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.014>.
- [5] R. Segura-Velázquez, G. Fragoso, E. Sciotto, A. Sarukhan, Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1338–1343, <https://doi.org/10.1128/CVI.00106-09>.
- [6] J. Vera Aguilera, A. Perez-Torres, J.C. Hernaiz-Leonardo, E. Moreno-Aguilera, D. Monteverde-Suarez, C. Vera-Aguilera, D. Estrada-Bárceñas, The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model, *Cancer Biother. Radiopharm.* 28 (2013) 682–690, <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1438>.
- [7] D. Torres-García, A. Pérez-Torres, K. Manoutcharian, U. Orbe, R. Servín-Blanco, G. Fragoso, E. Sciotto, GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model, *Vaccine* 35 (2017) 5653–5661, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.060>.
- [8] J. Vera Aguilera, A. Perez-Torres, C. Vera Aguilera, M.S. Block, N. Duma, G. Ventolini, R. Martinez-Zaguilan, S.R. Sennoune, In vivo effect of the parasite derived peptide GK-1, anti-PD-L1 and GK-1/anti-PD-L1 combination in experimental melanoma. Potential novel treatment pathways, *J. Clin. Oncol.* 35 (2017) e21038–e21038, https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e21038.
- [9] L. Sánchez-Hernández, L. Montero, R. Mojica-Espinosa, J.P. Reyes-Grajeda, J. Cervantes-Torres, R.M. Parkhouse, G. Fragoso, E. Sciotto, Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis, *Immunol. Lett.* 201 (2018) 20–30, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.010>.
- [10] L. Zitzvogel, G. Kroemer, CD103⁺ dendritic cells producing interleukin-12 in antitumor immunosurveillance, *Cancer Cell* 26 (2014) 591–593.
- [11] G. Piñón-Zárate, M.Á. Herrera-Enríquez, B. Hernández-Téllez, K. Jarquín-Yáñez, A.E. Castell-Rodríguez, GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma, *J Immunol Res* 2014 (2014) 158980, <https://doi.org/10.1155/2014/158980>.
- [12] K. Abdi, N. Singh, P. Matzinger, T-cell control of IL-12p75 production, *Scand. J. Immunol.* 64 (2006) 83–92, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01767.x>.
- [13] R.E. Toes, F. Ossendorp, R. Offringa, C.J. Melief, CD4 T cells and their role in anti-tumor immune responses, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 753–756 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049938> (accessed March 22, 2019).
- [14] J. Borst, T. Ahrends, N. Bábala, C.J.M. Melief, W. Kastenmüller, CD4 + T cell help in cancer immunology and immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 635–647, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0044-0>.
- [15] J. Cervantes-Torres, I. Gracia-Mora, R. Segura-Velázquez, R. Montero-Montoya, J. Espinosa-Aguirre, M.E. Gonsébat, R. Camacho-Carranza, M. Rivera-Huerta, F. Sanchez-Bartez, M. Tinoco-Méndez, P. Ostrosky-Wegman, G. Fragoso, E. Sciotto, Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1566359>.

Molecular Immunology

Helminth-derived peptide GK-1 induces Myd88-dependent pro-inflammatory signaling events in bone marrow-derived antigen-presenting cells --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MIMM_2020_124R1
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	GK-1 peptide; macrophages; Dendritic cells; MAPKs; NF- κ B
Corresponding Author:	Gladis Fragoso UNAM Mexico City, Mexico
First Author:	Laura Montero
Order of Authors:	Laura Montero Jacquelyne Cervantes-Torres Edda Scitutto Gladis Fragoso
Abstract:	<p>GK-1 is an immunomodulatory, 18-aa-long peptide that has been proved to promote the activation of mouse peritoneal macrophages and LPS-pulsed mouse bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs). This study is aimed to explore the mechanisms underlying the activation of these antigen-presenting cells (APCs) by GK-1. In our study, GK-1 up-regulated in vitro the expression of CD86 and CD40, and it increased the secretion of NO in bone marrow-derived macrophages (BM-DMs). In BM-DCs, GK-1 upregulated the expression of MHC class II and CD86. Additionally, GK-1 was found to be involved in the phosphorylation of MAPK p38 and ERK1/2 and in Myd88-dependent activation of NF-κB in both antigen-presenting cell types. In vivo, GK-1 increased the secretion of IL-15, CCL2, and IL-6 through a Myd88-dependent mechanism. This study demonstrated that GK-1 promotes the activation and effector activity of APCs through a mechanism dependent on Myd88, probably involving a Toll-like receptor as a target.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Oscar Bottasso bottasso@idicer-conicet.gov.ar His research in the field of immunology has a large translational component, several of them with impact in the field of Public Health.</p> <p>Constantino López-Macías constantino@sminmunologia.mx His research is focused to study the mechanisms involved in the generation of long lasting Immunity and the application of this knowledge to develop new adjuvants and vaccines.</p> <p>R. Michael E Parkhouse parkhous@igc.gulbenkian.pt His research is focused in the study of how pathogens control immune responses to offer novel approaches for the manipulation of the immune responses in health and disease, with novel strategies to downregulate the immune system.</p>
Response to Reviewers:	<p>-Reviewer 1 1. In section 2.8. Immunoblotting, the authors should describe the methods simply. R: This section was edited in the revised manuscript. In order to improve the description of this part of the methods, a section describing the extraction of proteins was added (Section 2.8) and in section 2.9 was only described the procedures for the immunoblotting</p> <p>2. Why do BMDM and BMDC cells upregulate CD86 only upon GK-1 stimulated? CD40 and MHCII were unaffected. R: CD86 and CD40 molecules were upregulated on BMDM, whilst for BMDC the MHC upregulation was more evident when LPS was used previously. In order to clarify our</p>