



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Obtención de variantes de un epítopo derivado de Mucina 1 de ratón a partir de una biblioteca de epítopos variables capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD8⁺ antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ALBERTO JOSUÉ ODALES PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA

[Facultad de Medicina](#)

Dr. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Odales Pérez Alberto Josué
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 20 de septiembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Obtención de variantes de un epítipo derivado de Mucina 1 de ratón a partir de una biblioteca de epítipos variables capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama**", dirigida por el Dr. **Manoutcharian Airapetian Karen**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Sciutto Conde Edda Lydia
VOCAL	Langley McCarron Elizabeth
VOCAL	Castell Rodríguez Andrés
VOCAL	Pavón Romero Lenin
SECRETARIO	Lizano Soberón Marcela

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de septiembre de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006

Odales Pérez Alberto Josué
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **18 de octubre** del presente año, conocieron su solicitud de **Cambio de Sinodal** de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias**, con la réplica de la tesis **"Obtención de variantes de un epítopo derivado de Mucina 1 de ratón a partir de una biblioteca de epítomos variables capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama"**, dirigida por elDr. **Manoutcharian Airapetian Karen**.

De su análisis se acordó nombrar al siguiente integrante en sustitución del investigador: **Pavón Romero Lenin (V)**.

Vocal: Constance Auvynet

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de octubre de 2021
Coordinadora



Dra. Claudia Lydía Treviño Santa Cruz

Contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006

Agradecimientos

El sustentante Alberto Josué Odales Pérez desea agradecer:

- A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha permitido desarrollar profesionalmente.
- Al Dr. Karen Manoutcharian Airapetian por permitirme estar en su grupo de investigación y por abrirme las puertas para estudiar la maestría y el doctorado.
- Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado para realizar este trabajo y por el otorgamiento de la beca de maestría y doctorado para el desarrollo de este, CVU 742861.
- Agradezco la asesoría técnica a la M. en B. María Elena Munguía Zamudio.
- A Patricia de la Torre por la secuenciación del ADN.
- Al LabNalCit-UNAM (CONACyT) por la ayuda técnica, capacitación y análisis de las muestras de citometría.
- A la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por el cuidado de los animales de experimentación.
- A los doctores que formaron parte del comité tutorial, Dr. Abraham Landa y Dr. Julio César Carrero, por sus consejos y ayuda para el desarrollo del tema de investigación.
- A los miembros del jurado:

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Dr. Andrés Castell Rodríguez

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dra. Constance Auvynet

- A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y orientación en los experimentos: M.Sc. Allan Noé Domínguez, Lic. Fernando Martínez, Lic. Jesús Guzmán y especialmente al M.Sc. Rodolfo Servín.

Índice

1 Introducción	1
1.1 Conceptos generales del cáncer	1
1.1.1 Características comunes del cáncer.....	1
1.1.2 Epidemiología del cáncer	3
1.2 Cáncer de mama.....	4
1.2.1 Clasificación del cáncer de mama.....	4
1.2.2 Tratamientos del cáncer de mama.....	5
1.2.3 Modelo murino de cáncer de mama con la línea celular 4T1	6
1.3 Respuesta inmunitaria contra el cáncer.....	6
1.3.1 Respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T CD8 ⁺	6
1.3.2 Teoría de la inmunoección.....	8
1.3.3 Mecanismos de escape tumoral.....	10
1.3.4 Inmunoterapias contra el cáncer.....	11
1.4 Mucina 1	13
1.4.1 Características de Mucina 1	13
1.4.2 Mucina 1 asociada al tumor	14
2 Justificación	16
3 Hipótesis	18
4 Objetivos	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos específicos	20
5 Materiales y Métodos	21
5.1 Diseño de las bibliotecas de epítomos variables derivadas de la región del péptido señal de Mucina 1 de ratón	21
5.2 Construcción de la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso M13	21
5.3 PCR para la verificación de la presencia del inserto en pG8SAET.....	24
5.4 Obtención de las clonas individuales de la biblioteca 9MUC1spL	24
5.5 Modelo murino de cáncer de mama.....	24
5.6 Ensayo de proliferación celular	25
5.7 Inmunofenotipificación.....	26

5.8 Análisis de la predicción <i>in silico</i> de la unión a las moléculas de clase I del MHC	27
5.9 Purificación y secuenciación del ADN plasmídico	27
6 Resultados	28
6.1 Evaluación del efecto antitumoral <i>in vivo</i> de los tratamientos con las bibliotecas de epítomos variables derivadas de la región del péptido señal de Mucina 1	28
6.1.1 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con la biblioteca 9MUC1spL	28
6.1.2 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con la biblioteca 23L.....	28
6.2 Obtención de las variantes del epítomo de interés a partir del repertorio de la biblioteca 9MUC1spL.....	30
6.2.1 Construcción de la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso	30
6.2.2 Selección de las variantes del epítomo de la biblioteca 9MUC1spL mediante ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8 ⁺	32
6.2.3 Confirmación de las variantes del epítomo seleccionadas de la biblioteca 9MUC1spL mediante ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8 ⁺	33
6.3 Caracterización de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva	36
6.3.1 Antigenicidad de las clonas en ausencia de inmunización.....	36
6.3.2 Predicción de unión de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva a las moléculas de clase I del MHC.....	37
6.4 Evaluación de las poblaciones inmunitarias luego del tratamiento con las bibliotecas de epítomos variables de Mucina 1	38
7 Discusión	41
8 Conclusión	48
9 Perspectivas	49
10 Referencias bibliográficas	50
11 Apéndices	64
11.1 Apéndice 1	64
11.2 Apéndice 2	65
11.3 Apéndice 3	66

Resumen

Las bibliotecas de epítomos variables se generan al substituir diferentes residuos aminoacídicos dentro de un epítomo reconocido por los linfocitos T CD8⁺. De esta forma, se han logrado obtener inmunógenos que tienen un efecto antitumoral superior en comparación con el tratamiento con sus respectivos epítomos silvestres. En este trabajo se construyeron dos bibliotecas de epítomos variables a partir de la región del péptido señal de Mucina 1 de ratón, que es un antígeno que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los cánceres. El tratamiento con la biblioteca de epítomos variables, 9MUC1spL, demostró una reducción del crecimiento tumoral en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento. Además, se observó una tendencia a la disminución del promedio de las macrometástasis pulmonares. Por otra parte, el tratamiento con la biblioteca de epítomos variables, 23L, que contempló toda la región del péptido señal de Mucina 1, disminuyó significativamente el área tumoral de los ratones.

Se realizaron ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8⁺ cultivados de manera individual con 84 clonas provenientes del repertorio de 9MUC1spL. A partir de los ensayos de proliferación se seleccionaron dos conjuntos de variantes del epítomo con 4 clonas cada uno. Estas indujeron proliferaciones mayor y menor en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de ratones vacunados terapéuticamente con la biblioteca 9MUC1spL en comparación con la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ provenientes de ratones inmunizados con 9MUC1spL en ausencia del tumor. A estos dos conjuntos de clonas se les denominó Selecciones Positiva y Negativa, respectivamente.

Este trabajo describe por primera vez la selección de variantes del epítomo del repertorio de una biblioteca de epítomos variables con el fin de agruparlas para obtener un mezcla de variantes con un efecto antitumoral superior en comparación con el repertorio completo. El estudio de las variantes del epítomo contribuye al entendimiento del mecanismo de acción de las bibliotecas de epítomos variables y, en general, de la inmunoterapia contra el cáncer. Además, es la primera vez que se informa la construcción de una biblioteca de epítomos variables a partir de un neoantígeno y, por lo tanto, es la primera vez que se prueba el efecto antitumoral *in vivo* de una biblioteca con estas características.

Abstract

Variable epitope libraries are generated by substituting different amino acid residues inside an epitope recognized by CD8⁺ T lymphocytes. This way, immunogens that have a superior antitumor effect when compared with their wild-type epitope treatment, have been obtained. In this work, two variable epitope libraries were generated from the murine Mucin 1-derived signal peptide region, that is an over-expressed antigen in most cancers. 9MUC1spL variable epitope library treatment showed a tumor reduction when compared with untreated mice. Moreover, a tendency was observed to the reduction of pulmonary macrometastasis mean. On the other hand, 23L variable epitope library treatment, that contained the entire Mucin 1-derived signal peptide region, significantly reduced tumor area in mice.

CD8⁺ T lymphocyte proliferation assays were performed with 84 individual clones from 9MUC1spL repertoire. From these proliferation assays, two set of epitope variants were selected with 4 clones each one. They induced higher and lower CD8⁺ T lymphocyte proliferations from therapeutically 9MUC1spL-vaccinated mice when compared with CD8⁺ T lymphocyte proliferations from non-tumor, 9MUC1spL-immunized mice. These two sets of clones were called Positive and Negative Selections, respectively.

This work describes for the first time the selection of epitope variants from a variable epitope library repertoire with the end of grouping them to obtain a variant mixture with a superior antitumor effect when compared with the entire repertoire. Studying epitope variants contributes to the understanding of the mechanism of action of variable epitope libraries and, in general, of cancer immunotherapy. Furthermore, it is the first time that a neoantigen-derived variable epitope library generation is reported and, therefore, it is the first time that the *in vivo* antitumor effect of a library with these characteristics is tested.

Abreviaturas

BEV	Biblioteca de epítomos variables
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
G-MDSC	Célula supresora derivada de mieloides de tipo granulocítica
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MHC-I	Molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad
MUC1	Mucina 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
TAA	Antígeno asociado al tumor
TCR	Receptor de células T
TIL	Linfocito infiltrante del tumor
TLR	Receptor tipo Toll
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TSA	Antígeno específico del tumor
VNTR	Región repetida en tándem de número variable de Mucina 1

1 Introducción

1.1 Conceptos generales del cáncer

1.1.1 Características comunes del cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas de origen genético en el que una célula o un conjunto de ellas comienzan a dividirse sin detenerse y pueden diseminarse a los restantes tejidos (www.cancer.gov). A pesar de ser un conjunto de enfermedades, entre todos los tipos de cánceres se pueden distinguir una serie de características comunes. En el año 2001, los investigadores Hanahan y Weinberg revisaron las características comunes o conocidos también como los *hallmarks* del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2001).

La primera característica son las señales proliferativas sostenidas mediante las cuales las células cancerosas proliferan constantemente ante la presencia de las señales mitogénicas como los factores de crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2011). La producción de los factores de crecimiento está normalmente regulada de forma tal que se mantiene la homeóstasis del tejido. Sin embargo, las células cancerosas producen sus propios factores de crecimiento, que las independiza de la producción de los factores por otras células y, por lo tanto, de manera autocrina se favorece su proliferación (Wu et al., 2021). Además, en las células cancerosas se observan con frecuencia sustituciones en los residuos aminoacídicos de las enzimas involucradas en la proliferación celular, producto a las mutaciones en el gen, que activan constitutivamente su actividad enzimática como es el caso de la fosfatidilinositol 3-cinasa (Gris-Oliver et al., 2021).

Normalmente, las células regulan su proliferación exacerbada mediante la acción de los genes supresores de tumores. Por ejemplo, la proteína retinoblastoma inhibe la progresión del ciclo celular mediante la inhibición del factor de transcripción E2F, las mutaciones que provocan una pérdida de la función de esta proteína promueven la proliferación de las células cancerosas (Knudsen et al., 2020). Además, la proteína TP53, que es conocida como el guardián del genoma, ante la presencia de daños en la secuencia de ADN detiene la progresión del ciclo celular y también puede inducir la apoptosis de la célula si el daño es irreparable (Levine, 2020). Por este motivo, es frecuente encontrar mutaciones en el gen que codifica a TP53 no funcional en las células tumorales. Por ejemplo, el cáncer de mama del subtipo basal se caracteriza porque la mayoría de sus células contienen

mutaciones en el gen p53 (Williams et al., 2018). Por lo tanto, la insensibilidad a los inhibidores del crecimiento es la segunda característica común del cáncer.

Las células tumorales necesitan un flujo continuo de nutriente que es transportado principalmente por la sangre, por lo tanto, la angiogénesis sostenida es otro de los *hallmarks* del cáncer. El factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF, que es producido por las células cancerosas en condiciones de hipoxia, aumenta la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos ya existentes (Khodabakhsh et al., 2021). A diferencia de los vasos sanguíneos en el tejido sano, los nuevos vasos sanguíneos formados en el tumor se caracterizan por un mayor número de ramificaciones y un flujo sanguíneo errático (Hanahan y Weinberg, 2011). El acortamiento de los telómeros es un proceso que surge como resultado de la replicación del ADN en las células e influye negativamente en que una célula no puede dividirse más allá de un número limitado de veces. Las células cancerosas expresan la telomerasa, que es una enzima encargada de la extensión de los telómeros y, por lo tanto, mediante este mecanismo se prolonga ilimitadamente el potencial replicativo de las células cancerosas, este último constituye el cuarto *hallmark* del cáncer (Noureen et al., 2021).

La apoptosis es un proceso de muerte celular mediante el cual las células que están bajo ciertas condiciones de estrés mueren de manera programada, por ejemplo, debido a daños en su genoma. Las células cancerosas desarrollan mecanismos para evadir la apoptosis, principalmente mediante las mutaciones en los genes involucrados en este proceso que implican la pérdida de la función de las proteínas (Singh et al., 2020). Por este motivo, se han descrito numerosas afectaciones en la activación de las caspasas y en los receptores de muerte celular como Fas y TRAILR presentes en las células tumorales (Maurus et al., 2018; Singh et al., 2020). Además, las células tumorales sobreexpresan los genes que codifican a las proteínas antiapoptóticas como la familia de Bcl-2 (Kapoor et al., 2020).

Por último, la migración de las células cancerosas del sitio primario donde se desarrolla el tumor y la posterior invasión y colonización de los tejidos distantes es otra de las características comunes de los cánceres (Fares et al., 2020). La disminución de la expresión de las moléculas de adhesión como la E-cadherina favorece la migración de las células cancerosas (Zhao et al., 2020). Además, la expresión de la N-cadherina se asocia a un aumento de la capacidad migratoria de las células y, por lo tanto, se ha descrito que la expresión de esta molécula en las células tumorales es un indicador del potencial de la formación de las metástasis en los pacientes (Masuda et al., 2020).

Las mutaciones y la inflamación crónica son dos características adicionales que permiten la generación de las restantes características comunes del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). Las mutaciones ocurren de manera espontánea en el ADN, son específicas para cada célula y se acumulan con el paso del tiempo (García-Nieto et al., 2019). Aunque este proceso es inherente a todas las células, las células tumorales se caracterizan por la inestabilidad genética (Yizhak et al., 2019; Neuse et al., 2020). Algunas de las mutaciones pueden favorecer la proliferación y la supervivencia de las células transformadas, por ejemplo, las mutaciones en los protooncogenes y en los genes supresores del tumor, respectivamente (Kontomanolis et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado que los carcinógenos no necesariamente inducen mutaciones *per se* en las células, sino que están involucrados otros procesos endógenos (Riva et al., 2020). Por ejemplo, la infiltración de las células inmunitarias en el tumor tiene un efecto paradójico, por una parte, participa en la eliminación de las células tumorales y, por otra parte, promueve la progresión del cáncer (Greten y Grivennikov, 2020). La inflamación proporciona los factores de crecimiento, supervivencia y angiogénicos, además, puede inducir mutaciones en el ADN de las células (Hanahan y Weinberg, 2011). Mediante estos mecanismos la inflamación crónica permite la transformación hacia la malignidad de las células en el tejido donde se desarrolla y persiste la inflamación (Michels et al., 2021).

1.1.2 Epidemiología del cáncer

En el 2020, se estimó que hubo 19,3 millones de casos nuevos y cerca de 10 millones de defunciones debido al cáncer en todo el mundo. Además, en el 60 % de todos los países, el cáncer representó la primera o la segunda causa de muerte en personas con menos de 70 años (Ferlay et al., 2021). Asimismo, se pronostica que para el 2070 habrá 34 millones de nuevos casos de cáncer (Soerjomataram y Bray, 2021). De todos los tipos de cánceres, el cáncer de mama es el de mayor incidencia (11,7 %) y el cáncer de pulmón es el de mayor mortalidad (18,0 %). Dividido por sexo, en los hombres, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia y mortalidad y en las mujeres es el cáncer de mama (Sung et al., 2021).

En México, considerando todos los tipos de cánceres, los dos sexos y todas las edades, el cáncer de mama es el de mayor incidencia con casi 30 000 nuevos casos y la primera causa de muerte con aproximadamente 8000 defunciones en el 2020 según el Observatorio Global del Cáncer (iarc.fr). En las mujeres mexicanas el cáncer de mama se diagnostica 11 años antes en comparación con las mujeres caucásicas, además, la

frecuencia de los tumores agresivos como el triple negativo es mayor en las mujeres mexicanas jóvenes (Romero-Cordoba et al., 2021).

1.2 Cáncer de mama

1.2.1 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad molecularmente heterogénea y su tratamiento depende en gran medida de las características moleculares del tumor (Pasha y Turner, 2021). Histológicamente, según el tipo de tejido donde se desarrolla, el cáncer de mama se clasifica en carcinoma ductal de tipo no específico o carcinoma lobular. El carcinoma ductal de tipo no específico representa la mayoría de los cánceres de mama con aproximadamente el 84 % de todos los casos (Zhao, 2021). Por otra parte, según la prueba PAM50, que determina la expresión génica de las células tumorales, el cáncer de mama se clasifica en cuatro subtipos fundamentales: luminal A, luminal B, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) enriquecido y tipo basal (Jørgensen et al., 2021).

Los cánceres de mama clasificados dentro del subtipo luminal A se caracterizan por la sobreexpresión del receptor de estrógeno y una baja expresión del HER2 y de los genes relacionados con la proliferación celular (Gao y Swain, 2018). Aproximadamente, el 40 % de todos los cánceres de mama se clasifican como luminales A y el pronóstico de los pacientes que presentan este tipo de tumores es favorable (Poudel et al., 2019). Los tumores clasificados dentro del subtipo luminal B tienen una menor expresión del receptor de estrógeno y una expresión relativamente alta de los genes relacionados con la proliferación celular (Harbeck et al., 2019). Además, dentro de los tumores clasificados como luminales B pueden encontrarse tumores que expresan el HER2 (Lee et al., 2019). Los tumores clasificados como luminales B abarcan aproximadamente el 20 % de los tumores mamarios y su pronóstico es peor en comparación con los pacientes que presentan un cáncer de mama clasificado como luminal A (Ding et al., 2019).

Por otra parte, el subtipo HER2 enriquecido representa aproximadamente el 25 % de todos los pacientes diagnosticados con cáncer de mama y se caracteriza por un alta expresión del HER2 y una baja expresión de los genes relacionados con los subtipos luminales (Loibl y Gianni, 2017). Por último, el subtipo basal es el de menor frecuencia con aproximadamente el 15 % de los cánceres de mama, sin embargo, es el de peor pronóstico para los pacientes con cáncer de mama (Li et al., 2021b). Esto se debe en gran parte a que las células cancerosas del subtipo basal tienen una alta expresión de los genes

relacionados con la proliferación celular, una alta inestabilidad genómica y un alto grado histológico (Alexandrou et al., 2019). Aproximadamente, el 90 % de los tumores de la mama clasificados dentro del subtipo basal son a su vez cánceres de mama triple negativos (TNBC), es decir, que no expresan los receptores de estrógeno y progesterona ni el HER2 (Bianchini et al., 2016). Por otra parte, el cáncer de mama TNBC contempla no solamente el subtipo basal, que representa aproximadamente el 70 % de los cánceres de mama TNBC, sino que también se pueden encontrar los restantes subtipos como, por ejemplo, los luminales (Marra et al., 2020).

1.2.2 Tratamientos del cáncer de mama

Los tumores clasificados como luminales son sensibles a la terapia endocrina, es decir, a los inhibidores de la unión del 17- β -estradiol al receptor de estrógeno o a la extirpación quirúrgica de los ovarios. El tamoxifeno es uno de los inhibidores más empleados en el tratamiento de los pacientes diagnosticados con cáncer de mama que expresan el receptor de estrógeno (Drăgănescu y Carmocan, 2017). El tratamiento con el tamoxifeno durante 5 o 10 años reduce la probabilidad de recurrencia de la enfermedad entre aproximadamente un 30-40 % (Bartlett et al., 2019). Sin embargo, el tratamiento con el tamoxifeno se ha visto asociado al desarrollo del cáncer endometrial (Grisdale et al., 2021). Las pacientes que alcanzan la menopausia durante el tratamiento con los inhibidores de la unión del estrógeno a su receptor, por lo general, su tratamiento se cambia a los inhibidores de la enzima aromatasa. Durante este período los estrógenos son producidos en el tejido adiposo, en donde la enzima aromatasa participa en la conversión de los andrógenos a estrógenos (Dackus et al., 2021).

Los pacientes con cáncer de mama que tienen sobreexpresado el HER2 se benefician de la terapia dirigida hacia esta molécula, principalmente mediante el empleo de los anticuerpos, por ejemplo, trastuzumab (Oh y Bang, 2020; Modi et al., 2020). El tratamiento de los pacientes con trastuzumab luego de la quimioterapia aumentó la supervivencia libre de la enfermedad, aunque como evento negativo se observó cardiotoxicidad en algunos pacientes (Piccart-Gebhart et al., 2005). La adición de pertuzumab, otro anticuerpo dirigido contra HER2, al tratamiento de trastuzumab y docetaxel aumentó la supervivencia global en un 14 % en comparación con el tratamiento estándar de trastuzumab y docetaxel (Swain et al., 2020).

Debido a que la mayoría de los tumores del subtipo basal son TNBC, los pacientes diagnosticados con este subtipo del cáncer de mama carecen de un blanco terapéutico a

diferencia de los restantes subtipos del cáncer de mama. Por este motivo, la quimioterapia citotóxica es el principal tratamiento para los pacientes diagnosticados con el cáncer de mama TNBC y aproximadamente un 40 % de ellos en estadio temprano presentan una respuesta patológica completa después del tratamiento con la quimioterapia estándar de antraciclinas y taxanos (Lee et al., 2020). Esta terapia tiene como objetivo eliminar la mayor cantidad posible de las células tumorales, sin embargo, esta estrategia ha demostrado a largo plazo un aumento del crecimiento tumoral y de las metástasis en algunos pacientes (Jiang et al., 2020). El cáncer de mama es curable en el 80 % de los casos mientras el tumor no haya generado metástasis, por ejemplo, los pacientes con cáncer de mama TNBC metastásico a pesar de recibir el tratamiento con quimioterapia finalmente fallecen producto de esta enfermedad con solamente un 30 % de supervivencia a los 5 años (den Brok et al., 2016).

1.2.3 Modelo murino de cáncer de mama con la línea celular 4T1

La línea celular 4T1 de adenocarcinoma mamario se aisló a partir de un tumor espontáneo desarrollado en un ratón BALB/c hembra MMTV⁺. Después de varios pases se seleccionó sin hacer ninguna mutagénesis por su resistencia a la 6-tioguanina (Dexter et al., 1978). El tumor que se desarrolla a partir de esta línea celular es altamente tumorigénico, poco inmunogénico y genera metástasis espontáneas a diferentes órganos (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000; Piranlioglu et al., 2019). Los tumores generados a partir de la línea 4T1 son principalmente TNBC y tienen características similares a los tumores de mama TNBC metastásicos en los humanos (Schrörs et al., 2020).

Una de las características distintivas de estos tumores es que expresan el factor de estimulación de colonias de tipo granulocíticas lo que aumenta el progenitor granulocítico (Netherby et al., 2017). Esto provoca una acumulación de las células supresoras derivadas de mieloides desde la primera semana de implantación en el tumor, bazo y pulmones con un patrón temporal distinto para las células supresoras derivadas de mieloides de tipo granulocíticas (G-MDSC) y monocíticas (Ouzounova et al., 2017).

1.3 Respuesta inmunitaria contra el cáncer

1.3.1 Respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T con un receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ se clasifican principalmente por la expresión de los correceptores CD4 o CD8. Ambos linfocitos T emergen del timo luego de pasar por el mecanismo de tolerancia central en los que los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺

con un TCR con una elevada afinidad por el complejo péptido-molécula de clase I o de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), respectivamente son eliminados (Klein et al., 2019). De esta forma, los linfocitos T no activados migran a través de los ganglios linfáticos en busca de una célula presentadora de antígeno que presente un epítipo en las moléculas de clase I o II del MHC que induzca su activación. Inicialmente, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ encuentran sus antígenos en diferentes células presentadoras de antígenos con un patrón temporal y espacial distinto para los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Eisenbarth, 2019). Posteriormente, ambas células convergen en una misma célula dendrítica residente en los ganglios linfáticos, en donde ocurre la ayuda del linfocito T CD4⁺ al linfocito T CD8⁺ para aumentar la actividad efectora de los últimos. La ayuda de los linfocitos T CD4⁺ proviene principalmente de la activación del receptor CD40 en la célula dendrítica que aumenta la presentación de los epítopos en las moléculas de clase I del MHC, aumenta la expresión de los ligandos (CD80/86 y CD70) de los receptores coestimuladores en los linfocitos T CD8⁺ y la secreción de citocinas (interferones, IL-2, IL-12 e IL-15) que ayudan a adquirir su actividad efectora y la inducción de la memoria (Borst et al., 2018). En cambio, se ha descrito que la activación de los receptores tipo Toll (TLR) en las células dendríticas, por ejemplo, del TLR3, que reconoce RNA de doble cadena, puede reemplazar a la ayuda proporcionada por los linfocitos T CD4⁺ (Hervas-Stubbs et al., 2007).

Se ha establecido que una vez activados los linfocitos T CD8⁺ pueden reconocer hasta 1 millón de epítopos distintos (Wooldridge et al., 2012). Esto contrasta con su estado no activado, en donde los linfocitos T CD8⁺ pueden ser activados por un repertorio menor de epítopos (Amrani et al., 2001). Esto se debe en parte a diferentes mecanismos de tolerancia periférica intrínsecos de los linfocitos T como la quiescencia o la ignorancia que evitan su activación exacerbada (ElTanbouly y Noelle, 2021). Se ha informado que en su estado efector los linfocitos T tienen una mayor expresión y densidad de los TCR, además, que para ejercer su actividad efectora no dependen de la coestimulación (von Essen et al., 2012; Gilfillan et al., 2021). Por lo tanto, se ha demostrado que un linfocito T efector puede reconocer hasta 100 veces menos cantidad de un antígeno en comparación con el mismo linfocito T no activado (Kimachi et al., 2003).

Una vez activados, los linfocitos T CD8⁺ migran a los sitios periféricos en busca de una célula blanco que presente el epítipo en la molécula de clase I del MHC (MHC-I) que sea reconocido por su TCR. Los linfocitos T CD8⁺ ejercen su actividad citotóxica

mediante la liberación de gránulos que contienen la granzima B que es una proteasa que induce la apoptosis en la célula blanco (Bálint et al., 2020). Otro mecanismo de inducción de la apoptosis es mediante los receptores de muerte celular (Fas y TRAILR) cuyos ligandos se encuentran en los linfocitos T CD8⁺ (Chaudhry et al., 2020). Mediante su actividad efectora, los linfocitos T CD8⁺ son capaces de eliminar a las células infectadas con un patógeno intracelular o a las células que han sufrido una transformación maligna (He et al., 2021).

1.3.2 Teoría de la inmunoección

La teoría de la inmunovigilancia descrita por los investigadores Burnet y Thomas establece que el sistema inmunitario puede reconocer y eliminar a las células transformadas (Burnet, 1957). En el año 2001 una investigación dirigida por Robert Schreiber ratificó el concepto original de la inmunovigilancia y estableció la teoría de la inmunoección, que se divide en tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Shankaran et al., 2001). La teoría de la inmunoección describe mejor la interacción del sistema inmunitario con las células cancerosas, en donde el sistema inmunitario puede adicionalmente editar o esculpir el tumor y de esta forma favorecer la progresión tumoral (Mittal et al., 2014). El esculpido del tumor se produce debido al reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T, en donde se favorece la presencia de las células tumorales menos inmunogénicas (O'Donnell et al., 2019).

En la fase de eliminación, las células transformadas son eliminadas totalmente por el sistema inmunitario y, por lo tanto, se restablece el tejido sano sin la presencia del tumor (Kubick et al., 2020; Holmström et al., 2020). En esta fase participan tanto las células del sistema inmunitario adaptativo como innato. Los linfocitos T CD8⁺ mediante el reconocimiento de los epítomos provenientes de los antígenos tumorales presentados en las MHC-I inducen la apoptosis en las células tumorales por la secreción de la perforina y la granzima B y por los receptores de muerte como TRAILR y Fas (Bálint et al., 2020; Chaudhry et al., 2020). Además, las células cancerosas que se encuentran en constante proliferación o que presentan daños en su genoma, expresan los ligandos de estrés como MICA y MICB que son reconocidos por el receptor NKG2D (Møller et al., 2020). Los linfocitos T $\gamma\delta$ y las células NK expresan NKG2D y mediante esta interacción se liberan los gránulos que contiene la granzima B y, por lo tanto, se eliminan a las células tumorales (Wu et al., 2019). Tradicionalmente, la función de los linfocitos T CD4⁺ fue participar en la ayuda a la activación de otras células como los linfocitos T CD8⁺ y los macrófagos.

Sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁺ participan directamente en la eliminación de las células tumorales mediado principalmente por el IFN- γ , que induce la expresión de las moléculas de clase II del MHC en las células tumorales (Quezada et al., 2010). La presencia del IFN- γ en el microambiente tumoral favorece la sensibilización de las células tumorales a la apoptosis, favorece la inducción de las citocinas angiostáticas y la presentación de los antígenos en las células dendríticas y en los macrófagos (Burke y Young, 2019). Los macrófagos y los neutrófilos participan en la eliminación de las células tumorales mediante la secreción de citocinas como el TNF- α , IL-1 e IL-12 que favorecen la activación de la respuesta inmunitaria (Mittal et al., 2014).

La fase de equilibrio se establece cuando algunas células cancerosas no son eliminadas en su totalidad y se genera un equilibrio entre la eliminación de las clonas inmunogénicas del tumor por parte del sistema inmunitario y la proliferación de las restantes clonas menos inmunogénicas (Wisdom et al., 2020). Esta fase es previa a la detección clínica del cáncer en los pacientes y se considera que es la fase más extensa en la teoría de la inmunoección. La evidencia que prueba la existencia de la fase de equilibrio proviene de estudios, en donde se demuestra una menor frecuencia de los epítomos más inmunogénicos en las células cancerosas de los pacientes (Schmidt et al., 2021). Además, el desarrollo del cáncer en los pacientes trasplantados proveniente de un donador que no tenía evidencia de la enfermedad demuestra la presencia de las células cancerosas en el órgano, que se mantuvieron bajo control del sistema inmunitario (MacKie y Reid, 2003). Se especula que los tumores que se encuentran en la fase de equilibrio pueden permanecer controlados por el sistema inmunitario durante toda la vida de la persona sin que exista evidencia de la enfermedad, aunque también se puede regresar a la fase de la eliminación (Dunn et al., 2004; Kubick et al., 2020).

Sin embargo, las células tumorales pueden escapar del control del sistema inmunitario y alcanzar la última fase de la teoría de la inmunoección en la que el tumor se convierte clínicamente detectable. El deterioro del sistema inmunitario del paciente guía a que el tumor crezca sin control por parte del sistema inmunitario, por ejemplo, las inmunodeficiencias adquiridas están asociadas al desarrollo de cánceres (Cañas-Ruano et al., 2020). Por otra parte, los cambios en la composición de la masa tumoral por la adquisición de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria, junto con la presión que ejerce el sistema inmunitario, que favorece la presencia de las clonas menos

inmunogénicas, guían a la transición hacia la fase de escape en los pacientes (Holmström et al., 2020).

1.3.3 Mecanismos de escape tumoral

Los tumores en la fase de escape presentan diversos mecanismos que les permiten evitar la eliminación y, por lo tanto, el control por parte del sistema inmunitario (Lorgulescu et al., 2018). Uno de los mecanismos más frecuentes son las mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina y del gen del transportador TAP que en conjunto disminuyen la maquinaria de procesamiento y presentación de los antígenos en las células tumorales (Germano et al., 2021; Marijt et al., 2021). De esta forma, se afecta el complejo péptido-molécula de clase I del MHC y, en consecuencia, el reconocimiento de los linfocitos T CD8⁺. Por otra parte, las células tumorales o del microambiente tumoral pueden secretar citocinas inmunosupresoras como el TGF- β y la IL-10, lo que disminuye la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ (Lim et al., 2021; Shaopeng et al., 2021). Además, estas citocinas favorecen la presencia de las células inmunosupresoras en el microambiente tumoral como los linfocitos T reguladores y las MDSC que impiden que los linfocitos T CD8⁺ eliminen a las células tumorales al disminuir su actividad citotóxica (Verma et al., 2019; Sheng et al., 2020).

Los mecanismos por los cuales las MDSC pueden disminuir la actividad efectora de los linfocitos T son mediante la producción de las especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno que disminuyen la señalización del complejo TCR y la proliferación de los linfocitos T (Ouzounova et al., 2017; Alshetaiwi et al., 2020). Además, las MDSC aumentan la concentración de las citocinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- β) y disminuyen la presencia de ciertos aminoácidos en el microambiente tumoral, como el triptófano, la cisteína y la arginina, que en conjunto disminuye la actividad efectora de los linfocitos T (Yang et al., 2020). La expresión del ligando PD-L1 (por sus siglas en inglés, *Programmed Death-Ligand 1*) en las MDSC, así como en las células cancerosas disminuye la actividad efectora de los linfocitos T CD8⁺ (Ju et al., 2020). Por último, otro de los mecanismos que contribuye al escape tumoral es la expresión de los ligandos de los receptores de muerte como FasL y TRAIL en las células cancerosas que pueden inducir la muerte en los linfocitos T efectores presentes en el microambiente tumoral (Rossin et al., 2019).

1.3.4 Inmunoterapias contra el cáncer

Las inmunoterapias son un tipo de tratamiento contra el cáncer que están enfocadas en potenciar la respuesta inmunitaria contra las células tumorales (Tan et al., 2021). Las inmunoterapias se basan en la teoría de la inmunovigilancia que establece que el sistema inmunitario es capaz de eliminar a las células tumorales (Kottke et al., 2021). Tradicionalmente, las inmunoterapias se han dividido en dos grandes grupos, inmunoterapias pasivas o activas, en dependencia de su función con respecto al sistema inmunitario del paciente (Galluzzi et al., 2014). Las inmunoterapias pasivas proporcionan los componentes o células efectoras ya activadas al paciente. Dentro de las inmunoterapias pasivas tenemos el empleo de los anticuerpos monoclonales, que debido a que tienen una elevada especificidad por su antígeno, se han empleado contra distintos blancos en la célula cancerosa (Almagro et al., 2018). El uso de trastuzumab en los pacientes con cáncer de mama que expresan el HER2 constituye un ejemplo del empleo de un anticuerpo monoclonal que ha mejorado el pronóstico de los pacientes con cáncer (Modi et al., 2020). Aunque tradicionalmente el uso de los anticuerpos en la inmunoterapia contra el cáncer se ha considerado como una inmunoterapia pasiva, en el caso de los anticuerpos dirigidos contra los *checkpoints* inmunitarios es considerado como una inmunoterapia activa. Los *checkpoints* inmunitarios son aquellos receptores cuya función es inhibir la activación o la actividad efectora de los linfocitos T. Las moléculas CTLA-4 (por sus siglas en inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PD-1 (por sus siglas en inglés, *Programmed Death-1*), así como su ligando PD-L1 son ejemplos de los *checkpoints* inmunitarios más empleados en la inmunoterapia contra el cáncer (Bagchi et al., 2021). Los anticuerpos dirigidos contra estas moléculas mantienen a los linfocitos en un estado efector activo en el paciente necesario para la eliminación de las células tumorales, por este motivo es que son considerados como una inmunoterapia activa (Robert, 2020). El tratamiento con los anticuerpos que bloquean los *checkpoints* inmunitarios ha demostrado tener efectos beneficiosos en la clínica, especialmente en los pacientes con melanoma, aunque también se ha empleado en los pacientes con cáncer de mama TNBC con una eficacia menor (Schmid et al., 2020; Tomita et al., 2020; Keenan y Tolaney, 2020).

Otro tipo de inmunoterapia pasiva es la transferencia adoptiva de las células T específicas por los epítomos presentados en las células tumorales (Chruściel et al., 2020). Los epítomos reconocidos por los linfocitos T provienen dos grandes grupos de antígenos: los

específicos del tumor o neoantígenos (TSA, por sus siglas en inglés, *tumor-specific antigens*) y los asociados al tumor (TAA, por sus siglas en inglés, *tumor-associated antigens*) (Stanojevic et al., 2021; Morisaki et al., 2021). Los TSA se generan principalmente por las mutaciones en el ADN de las células tumorales que conllevan a cambios en la secuencia de los antígenos tumorales y son únicos en cada paciente (Hu et al., 2021). El uso en la clínica de los TSA ha demostrado que estos antígenos son poco inmunogénicos y abundantes, por lo tanto, se ha puesto en duda su relevancia en la inmunoterapia contra el cáncer (Manoutcharian y Guzman, 2019; Gupta et al., 2021). Por otra parte, los TAA son antígenos propios que están expresados tanto en el tumor como en los tejidos sanos, en consecuencia, la respuesta inmunitaria hacia los TAA está sometida a los mecanismos de tolerancia (Yadav et al., 2021). Adicionalmente, inducir una respuesta efectiva contra los TAA conlleva a un riesgo de generar autoinmunidad en el paciente (Sahin et al., 2020). También se ha empleado la transferencia adoptiva de las células T modificadas genéticamente que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés, *Chimeric Antigen Receptors*) que consiste en la fusión del dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina al dominio de señalización de los linfocitos T (Samur et al., 2021). Esto permite que los linfocitos T reconozcan y eliminen al tumor sin la restricción al complejo de péptido-molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (Wang et al., 2020).

Dentro de las inmunoterapias activas contra el cáncer está el uso de las vacunas que se emplean para inducir una respuesta inmunitaria específica contra las células tumorales (Ott et al., 2020; Li et al., 2021a). Las vacunas contra el cáncer se han construido en diferentes formatos, por ejemplo, péptidos sintéticos, ADN, ARN o células dendríticas activadas *in vitro* con los antígenos tumorales y luego reintroducidas al paciente (Linette et al., 2019; Ott et al., 2020; Sahin et al., 2020; Peng et al., 2021). Este último formato de vacunas con base en las células dendríticas es la única vacuna (sipuleucel-T) aprobada por la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) para el tratamiento del cáncer. Sipuleucel-T se aprobó para el tratamiento de los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (McKay et al., 2020). Dicho tratamiento utiliza la fusión de la proteína fosfatasa ácida prostática y el GM-CSF para activar a las células dendríticas del paciente y ofreció 4 meses de supervivencia a los pacientes que recibieron la vacuna en comparación con el grupo placebo (Kantoff et al., 2010).

En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un nuevo tipo de inmunógeno denominado bibliotecas de epítomos variables (BEV) como alternativa al empleo de las secuencias silvestres del epítomo en la inmunoterapia (Pedroza-Roldan et al., 2009). Las BEV se generan al substituir, por cualquiera de los 20 aminoácidos, diferentes residuos en un epítomo proveniente de diferentes antígenos reconocido por los linfocitos T CD8⁺ (NoeDominguez-Romero et al., 2014). De esta forma se generan miles o millones de variantes del epítomo, en dependencia del número de substituciones, que en conjunto conforman el repertorio de las BEV (Domínguez-Romero et al., 2020). El objetivo del tratamiento con las BEV es aumentar la respuesta inmunitaria hacia el tumor mediante la generación de una respuesta de linfocitos T que reconozcan eficazmente a la secuencia silvestre o a los cambios que puedan ocurrir en el epítomo debido a la inestabilidad antigénica que se presenta en las células tumorales (Servín-Blanco et al., 2018). El efecto antitumoral de las BEV se ha demostrado *in vivo* en un modelo murino de cáncer de mama con la inoculación de las células 4T1. El tratamiento con todo el repertorio de las BEV ha demostrado reducir significativamente el área y el volumen de los tumores en comparación con el tratamiento con el epítomo silvestre. Asimismo, se ha observado una disminución significativa del promedio de las macrometástasis pulmonares en los ratones tratados con las BEV (Domínguez-Romero et al., 2020; Martínez-Cortés et al., 2021).

1.4 Mucina 1

1.4.1 Características de Mucina 1

Mucina 1 (MUC1) es una glicoproteína de membrana con un peso molecular de aproximadamente 500 KDa que se expresa normalmente en la superficie apical de las células epiteliales de varios órganos como la glándula mamaria, esófago, estómago, próstata y pulmones (Sirviö et al., 2019). MUC1 recién sintetizada sufre un corte autoproteolítico en su región extracelular, lo que divide a la proteína en dos cadenas polipeptídicas, MUC1-C y MUC1-N, que se mantienen unidas a través de enlaces de hidrógenos (Levitin et al., 2005). MUC1-C contiene una región extracelular corta, la región transmembranal y el tallo citoplasmático y en conjunto pesa aproximadamente 17 KDa (Nath y Mukherjee, 2014). Por otra parte, MUC1-N es totalmente extracelular y contiene la región repetida en tándem de número variable (VNTR, por sus siglas en inglés *Variable Number Tandem Repeat*), en donde 20 residuos aminoacídicos se pueden repetir de 20 a 120 veces (Chen et al., 2021). La región VNTR es rica en residuos de prolina, treonina y serina y se encuentra altamente O-glicosilada que pueden aportar hasta un 90

% de la masa molecular de la proteína madura (Beckwith y Cudic, 2020). La función de MUC1 en la célula es la hidratación, lubricación y protección del epitelio debido a la presencia de las cadenas oligosacáridicas en su región extracelular, lo que crea una barrera física que limita la accesibilidad y la colonización de los patógenos (Dhar y McAuley, 2019). También se ha descrito que MUC1 disminuye la inflamación promovida por los patógenos, principalmente como regulador negativo de la señalización de los TLR (Gibier et al., 2021).

1.4.2 Mucina 1 asociada al tumor

Mucina 1 es un antígeno que se encuentra sobreexpresado en un 80 % de todos los tipos de cánceres, incluido los tumores generados por la línea 4T1 que son TNBC (Liu et al., 2018; Feng et al., 2020). Las características de MUC1 en el tejido sano son diferentes a las de MUC1 asociada al tumor. En las células tumorales MUC1 se encuentra hipoglicosilada debido a una disminución de las enzimas encargadas de la incorporación del núcleo 2 de glicanos y por la adición del ácido siálico lo que provoca una terminación prematura de la elongación de las cadenas oligosacáridicas (Whitehouse y Burchell, 1997; Beckwith y Cudic, 2020). La hipoglicosilación de MUC1 influye en la estabilidad de la proteína y en su localización, pero sin aumentar su mecanismo de degradación (Khemiri et al., 2019).

La hipoglicosilación expone el núcleo proteico de MUC1 a las proteasas lo que provoca la liberación de MUC1-N, ocasionando un cambio conformacional en MUC1-C que activa vías de señalización celular (Kufe, 2013; Ma et al., 2021). La región citoplasmática de MUC1 contiene 7 residuos de tirosina altamente conservados que pueden ser fosforilados y servir de sitio de anclaje a moléculas como PI3K/Akt, c-Src y β -catenina (Thompson et al., 2006; Hata et al., 2019). Se ha descrito que la fosforilación de MUC1-C aumenta la interacción con HSP90, lo que guía a que MUC1-C se ubique en la mitocondria, en donde inhibe la función de Bax (Supruniuk y Radziejewska, 2021). Adicionalmente, se ha establecido que MUC1-C suprime la vía de señalización de TP53 e inhibe la activación de la procaspasa 8, que en conjunto disminuye la apoptosis en las células cancerosas (Yasumizu et al., 2020; Supruniuk y Radziejewska, 2021). En condiciones de hipoxia, la sobreexpresión de MUC1 promueve la expresión de los factores que favorecen la angiogénesis. La sobreexpresión de MUC1 estabiliza a HIF-1 α y este a su vez se une al promotor de MUC1 y de otros genes, lo que aumenta la expresión de estos en condiciones de hipoxia (Nath y Mukherjee, 2014).

MUC1-C se ha encontrado en el núcleo celular, en donde reprime la expresión de la E-cadherina, lo que debilita las uniones adherentes. Asimismo, la localización de MUC1-C en el núcleo promueve la expresión de los genes relacionados con el proceso de transición epitelio-mesenquimal (Khodabakhsh et al., 2021). Además, se ha demostrado que MUC1 se une a las moléculas de adhesión celular, por lo tanto, se ha descrito que la sobreexpresión de MUC1 promueve la invasión y la metástasis de las células cancerosas (Hayashi et al., 2001; Deng et al., 2020). La pérdida de la polaridad celular hace que MUC1 se redistribuya por toda la superficie celular y, por lo tanto, que esté en contacto con receptores con actividad de cinasa de tirosina que antes estaban ubicados en la región basolateral (Chen et al., 2021). La interacción de MUC1 con los receptores promueve que se mantenga activa la señalización celular inducida por estos (Piyush et al., 2017). Por este motivo, la sobreexpresión de MUC1 en los tumores está asociada con un pronóstico poco favorable para los pacientes con cáncer (Chao et al., 2019; Li et al., 2019).

2 Justificación

El cáncer de mama es el tipo de tumor con mayor incidencia y mortalidad en las mujeres (Ferlay et al., 2021). En la actualidad existen diferentes enfoques terapéuticos que se utilizan para tratar a los pacientes con cáncer. De manera particular, las inmunoterapias potencian la capacidad que tiene el sistema inmunitario de reconocer y eliminar a las células tumorales (Tan et al., 2021). En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un nuevo tipo de inmunógeno denominado bibliotecas de epítomos variables (NoeDominguez-Romero et al., 2014). Aunque se ha probado que las BEV tienen efectos antitumorales, cuando se han aislado variantes del epítomo de sus repertorios se ha encontrado que cada variante induce en diferente grado la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ (Domínguez-Romero et al., 2020; Martínez-Cortés et al., 2021). Por otra parte, se ha observado que los linfocitos T provenientes de ratones tratados terapéuticamente con una BEV proliferan mayor o menormente en presencia de clonas de la BEV utilizada en la vacunación en comparación con la proliferación inducida por la misma clona en los linfocitos T provenientes de ratones inmunizados con la BEV en ausencia del tumor (Domínguez-Romero et al., 2020). Por lo tanto, la presencia del tumor en los ratones modifica la proliferación de los linfocitos T activados con todo el repertorio de las BEV (Martínez-Cortés et al., 2021).

Probablemente, un grupo de variantes del epítomo aisladas del repertorio de las BEV tiene un efecto antitumoral superior en comparación con todo el conjunto de miles de variantes que se emplean normalmente en la estrategia de inmunización con las BEV. El posible efecto antitumoral que presentan en diferente grado las variantes del epítomo está potencialmente disminuido en las BEV debido a que se encuentran junto con el resto de las variantes que conforman todo el repertorio de la biblioteca. Por este motivo, agruparlas con base en un comportamiento común puede ser efectivo para caracterizarlas y demostrar el papel que pueden tener en el tratamiento contra el cáncer.

Debido a las características que Mucina 1 presenta en los tumores, este ha sido reconocido como el segundo mejor antígeno para utilizarse en la inmunoterapia contra el cáncer (Cheever et al., 2009). A pesar de las potencialidades de MUC1, los resultados de las inmunoterapias que han dirigido una respuesta inmunitaria hacia este antígeno no han sido los esperados (Syrkina y Rubtsov, 2019). Los epítomos de MUC1 reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ provienen principalmente de la región del péptido señal de la

proteína, que en el caso de MUC1 de ratón abarca los primeros 23 residuos aminoacídicos de la proteína (Kovjazin et al., 2011). Los epítomos provenientes de los péptidos señales de diferentes proteínas son considerados neoantígenos y solamente se presentan en las células tumorales con deficiencias en la maquinaria de procesamiento y presentación de los antígenos (Marijt et al., 2021). Este es un mecanismo común empleado por las células tumorales para evadir el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunitario (Garrido et al., 2020). Por este motivo, decidimos realizar una BEV a partir de un epítomo de Mucina 1 de ratón proveniente de la región del péptido señal de MUC1. Con esto, se desea probar si la estrategia de las bibliotecas de epítomos variables es capaz de inducir una respuesta inmunitaria superior en comparación con el tratamiento con el epítomo silvestre. Además, a partir de la BEV de MUC1 se pretende seleccionar un conjunto de clonas con base en ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8⁺ para probar cuál es su valor en la inmunoterapia contra el cáncer.

3 Hipótesis

Si una biblioteca de epítomos variables de Mucina 1 contiene variantes del epítomo con un mayor efecto antitumoral que otras, la identificación de estas variantes permitirá generar una vacuna con mayor eficacia antitumoral en comparación con la biblioteca original completa.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antitumoral de las variantes de un epítipo del péptido señal de Mucina 1 de ratón seleccionadas a partir de una biblioteca de epítipos variables que inducen proliferaciones mayor y menor en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de un grupo de ratones vacunados terapéuticamente con la biblioteca de epítipos variables en comparación con un grupo de ratones inmunizados con la biblioteca en ausencia del tumor.

4.2 Objetivos específicos

- Construir la biblioteca de epítomos variables, 9MUC1spL, presentada en bacteriófago filamentoso M13 a partir de un epítopo de 9 residuos del péptido señal de Mucina 1 de ratón.
- Aislar clonas de la biblioteca 9MUC1spL y obtener los bacteriófagos individuales que expresan en su superficie las variantes del epítopo de Mucina 1.
- Seleccionar dos grupos de clonas que inducen proliferaciones mayor y menor en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de un grupo de ratones con tumores y vacunados con 9MUC1spL en comparación con el valor de la proliferación que induce la misma clona en estas células provenientes de los ratones sin tumores e inmunizados con 9MUC1spL.
- Caracterizar la respuesta efectora *in vitro* de los linfocitos T CD8⁺ que reconocen las clonas seleccionadas.
- Evaluar el efecto antitumoral de las clonas seleccionadas y del repertorio completo de la biblioteca 9MUC1spL en el modelo murino de cáncer de mama con las células 4T1.

5 Materiales y Métodos

5.1 Diseño de las bibliotecas de epít opos variables derivadas de la región del péptido señal de Mucina 1 de ratón

Se eligió el epít opo de 9 residuos, PGIRAPFFL, que proviene de la región del péptido señal de MUC1 de ratón debido a que es el que mejor se predice que se une a las tres moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad del ratón BALB/c (H-2^d) según la herramienta de análisis IEDB. A partir de este epít opo se construyó la biblioteca de epít opos variables, 9MUC1spL, mediante la aleatorización de 3 posiciones dentro del epít opo distintas de las posiciones 2 y 9 involucradas en el anclaje a las MHC-I del haplotipo H-2^d. El diseño de la biblioteca 9MUC1spL es: PGXRXPFXL, donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos. Por lo tanto, la complejidad de 9MUC1spL es de 8000 variantes del epít opo de MUC1.

Adicionalmente, a partir de la región completa del péptido señal de MUC1, que contempla a los primeros 23 residuos de la región amino terminal: ₁MTPGIRAPFFLLLLLASLKGFLA₂₃, se construyó una segunda biblioteca de epít opos variables. La BEV se denominó 23L e incluyó 5 posiciones aleatorizadas dentro de la secuencia. En consecuencia, la complejidad teórica de 23L es de $3,2 \times 10^6$ variantes de la secuencia silvestre multiepitópica. El diseño de la biblioteca 23L es: MTPGXRAPXFLXLLLXSLKXFLA, donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos. Ambas BEV, 9MUC1spL y 23L, así como sus respectivas secuencias silvestres se sintetizaron en el formato de péptido sintético en la compañía GenScript.

5.2 Construcción de la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso M13

El vector fagémido pG8SAET se empleó en la construcción tanto de la biblioteca 9MUC1spL, así como de su secuencia silvestre mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso M13. pG8SAET contiene las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción NcoI y BamHI en el extremo 5' del gen que codifica a la proteína VIII que es mayoritaria en la cápside del bacteriófago M13 (Figura 1). Se procedió a la purificación del vector con el juego de reactivos *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega) según las instrucciones del fabricante. El vector se digirió de manera independiente con las enzimas NcoI y BamHI (New England Biolabs) en solución

tamponada NEB 3.1 (New England Biolabs) y se inactivó con calor según las instrucciones del fabricante. A continuación, se desfosforilaron los extremos 5' con la enzima CIAP (Invitrogen). El vector se purificó a partir de banda de gel de electroforesis con el juego de reactivos *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Por otra parte, se diseñaron oligonucleótidos para la construcción de la biblioteca 9MUC1spL (9muc1spl) y de la secuencia silvestre (9muc1spn) (Tabla 1). Los oligonucleótidos 5'DAMP y 3'DAMP se emplearon para introducir los sitios reconocidos por las enzimas de restricción NcoI y BamHI, respectivamente, para el clonaje en el vector fagémido pG8SAET (Tabla 1).

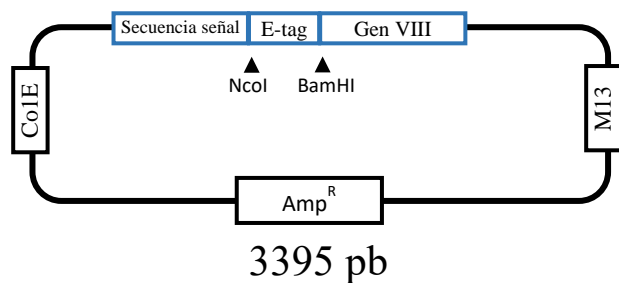


Figura 1: Representación esquemática del vector fagémido pG8SAET. El vector contiene la secuencia que codifica a la proteína VIII (gen VIII) que es mayoritaria en la cápside del bacteriófago M13. Río arriba del gen VIII se encuentran las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción NcoI y BamHI.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados en la construcción de la biblioteca 9MUC1spL y de su secuencia silvestre

Nombre	Secuencia
9muc1spn	GTATATTACTGTGCGCCGGGCATTCGTGCACCGTTTTTCTGTGGGGCCAGGGAACC
9muc1spl	GTATATTACTGTGCGCCGGGCNNKCGTNNKCCGTTTNNKCTGTGGGGCCAGGGAACC
5'DAMP	TGATATTCGTACTIONGAGCCATGGTGTATATTACTGTGCG
3'DAMP	ATGATTGACAAAGCTTGGATCCCTAGGTTCCCTGGCCCCA

N puede ser A, G, T o C; K puede ser G o T.

Para el ensamblaje y amplificación de los oligonucleótidos se preparó una mezcla de reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que contenía cada uno de los oligonucleótidos (1 pmol/ μ L) en una solución tamponada DreamTaq 1x ($MgCl_2$, 2 mM) y los dNTP (0,4 mM). Se realizaron las siguientes incubaciones: 94 °C 30 s, 84 °C 1 min,

74 °C 1 min, 64 °C 1 min, temperatura ambiente 5 min y 4 °C 15 min en un termociclador (Corbett research). Se le adicionaron 5 U de la enzima DreamTaq ADN polimerasa (Thermo Scientific) y se realizaron las siguientes incubaciones: 94 °C 7 min y 7 ciclos de 94 °C 1,5 min, 57 °C 2 min, 72 °C 2 min en un termociclador (Corbett research). Del producto de esta reacción se tomó 1 ng de dsADN y se adicionó a una mezcla que contenía los dNTP (0,4 mM), 5'DAMP y 3'DAMP (1 pmol/μL), solución tamponada DreamTaq 1x (MgCl₂, 2 mM) y 1,5 U de la enzima DreamTaq ADN polimerasa (Thermo Scientific) en un volumen final de 25 μL y se realizó el siguiente tratamiento: 95 °C 3 min, 30 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s y 70 °C 30 s.

Los productos de la amplificación se verificaron en geles de agarosa al 2 % y se purificaron por medio del juego de reactivos *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se digirieron de manera secuencial con 30 U de las enzimas BamHI y NcoI (New England Biolabs) durante 1 h a 37 °C en solución tamponada NEB 3.1 (New England Biolabs). El ADN doble digerido se purificó de banda de electroforesis con el juego de reactivos *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los productos de las digestiones se verificaron en geles de agarosa al 2 %. En las reacciones de ligación se empleó una relación molar 1:3 del vector al inserto y se incubó toda la noche a 15 °C con 0,9 unidades Weiss de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) en solución tamponada Ligasa 1x (Promega). El producto de la ligación se purificó con el juego de reactivos *DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research).

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un volumen de 500 mL de cultivo de la cepa TG1 de *Escherichia coli* en fase exponencial de crecimiento (DO = 0,7). Las células se lavaron tres veces en una solución de glicerol al 10 %. Todas las muestras de ADN se electroporaron en la cepa TG1 de *E. coli* por medio de un electroporador Gene Pulser II (Biorad) a un voltaje de 2500 V. A las células electroporadas se les añadió 1 mL de medio SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubaron a 37 °C durante 30 min en agitación a 250 rpm (Gyromax 737, Amerex Instruments, Inc.). Las células que contienen ambas construcciones se sembraron en medio sólido LB agar (Invitrogen) con carbenicilina (50 μg/mL) y se incubó toda la noche a 37 °C. Se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) en las placas de cultivo como medida de la diversidad de la biblioteca.

5.3 PCR para la verificación de la presencia del inserto en pG8SAET

Se tomaron colonias aisladas de la cepa TG1 de *E. coli* electroporadas con la construcción de interés. Cada colonia se resuspendió en 20 μ L de agua y se incubó a 85 °C por 10 min. Se centrifugó a 13 000 rpm 5 min y se tomaron 5 μ L del sobrenadante. Se adicionaron a la mezcla 1 μ L de la solución tamponada Dream Taq 10X de Thermo Scientific, 0,4 μ L de los dNTP (10 mM), 0,2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 5'DAMP y 3'DAMP (25 pmol/ μ L) y 0,1 μ L de la enzima Dream Taq Polimerasa (5 U/ μ L) de Thermo Scientific para un volumen final de 15 μ L. Se realizó el siguiente tratamiento: 95 °C 3 min, 20 ciclos de 95 °C 30 s, 62 °C 30 s y 72 °C 30 s, luego se incubó a 72 °C 4 min y finalmente a 4 °C 1 min en un termociclador (Corbett research). Los productos de esta reacción se verificaron en geles de agarosa al 2 %.

5.4 Obtención de las clonas individuales de la biblioteca 9MUC1spL

Se realizaron 3 diluciones seriadas (1/5) de las células *E. coli* transformadas con el fagémido que contiene la información de la biblioteca 9MUC1spL y se sembraron en medio LB agar con carbenicilina (50 μ g/mL). Se inoculó medio 2xYT con carbenicilina (50 μ g/mL) en placas de cultivo de 1 mL con una colonia/pozo. Se incubó 6 h a 37 °C, 200 rpm. Se adicionó el bacteriófago ayudador M13KO7 (1 μ L/pozo) y se incubó 30 min a 37 °C sin agitación. Se dejó toda la noche a 200 rpm, 28 °C. Al sobrenadante del cultivo bacteriano se le adicionó 1/5 del volumen de una solución de polietilenglicol al 20 % y 2,5 M de NaCl y se dejó toda la noche. Se centrifugó a 5000 rpm por 30 min y se resuspendió en 100 μ L de TBS.

5.5 Modelo murino de cáncer de mama

Se inocularon 10^4 células viables 4T1 (American Type Culture Collection) de adenocarcinoma mamario de un pase 3 en un volumen de 100 μ L de solución salina tamponada con fosfatos en la glándula mamaria derecha de ratones BALB/c hembra de 5 a 6 semanas de edad. Cada inmunización se realizó al día 5 postimplante de la línea celular vía subcutánea con 180 μ g del péptido sintético de interés (GenScript) y 180 μ g del adyuvante ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C) (Sigma-Aldrich) en la mama del flanco contrario en donde se realizó la inoculación de la línea celular. El área tumoral se midió por el producto del largo x ancho del tumor mediante el uso de un pie de rey digital (Fowler sylvac). Al día 30 postimplante se sacrificaron los ratones, se perfundieron los pulmones con la solución Bouin (ácido acético al 5 %, formaldehído al 9 % y ácido pícrico

al 0,9 %) y se contó el número de las macrometástasis en los pulmones. Todos los experimentos con los animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de cuidado y uso animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y de acuerdo con las recomendaciones en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorios del NIH.

5.6 Ensayo de proliferación celular

Los ratones se sacrificaron 10 días posteriores a la inmunización o al día 15 postimplante de la línea celular. Se recolectaron las células del bazo en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1x de estreptomina, 1x de penicilina, 1 mM de piruvato de sodio, 1x de aminoácidos no esenciales y 1x de β -mercaptoetanol (RPMI suplementado). Los eritrocitos se lisaron con una solución de lisis (155 mM de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 y 1 mM de EDTA) a 37 °C durante 7 min. Las células se tiñeron con el fluorocromo éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) a 1 μM durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS y 5 % de suero fetal bovino a 20 °C.

$2,5 \times 10^5$ células marcadas se cultivaron con $1,5 \times 10^9$ ufc de cada una de las variantes de MUC1 de ratón durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las células se centrifugaron a 400 G durante 10 min y se resuspendieron en PBS, 1 % de suero fetal bovino, 0,1 % de azida de sodio y los anticuerpos antiCD3-APCeFluor780 (eBioscience) y antiCD8-PE (eBioscience). Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min y posteriormente se le adicionaron 200 μL de PBS con suero fetal bovino al 1 %. Se centrifugó a 400 G durante 10 min y las células se resuspendieron en PBS, paraformaldehído (1 %) y 7AAD (Tonbo).

Todas las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune Azul-Rojo (Applied Biosystems) y se analizaron con el programa FlowJo X. Primeramente, para el análisis del porcentaje de la proliferación se realizó una gráfica en el que se seleccionaron los singletes (FSC-H vs. FSC-A). A partir de los singletes se realizó un gráfico de granularidad vs. 7AAD, en el que se seleccionaron las células vivas. Se realizó un gráfico de tamaño vs. granularidad, en el que se seleccionó la población de los linfocitos. A partir de la región seleccionada de los linfocitos se hizo un gráfico de granularidad vs. CD3 y se seleccionó la población CD3^+ . Se realizó un gráfico de granularidad vs. CD8^+ y a partir de la población $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ se determinó la proliferación mediante la dilución del CFSE

en los gráficos de histograma. Se consideró el valor de la proliferación inducido por una clona en particular si fue superior al de la proliferación en ausencia de antígeno + 2 veces la desviación estándar de la proliferación en ausencia de antígeno.

Se consideró que una clona era negativa si el valor de la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ del grupo Inmunogenicidad Pura era mayor que la proliferación inducida por la misma clona en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo Terapia más las desviaciones estándar de la proliferación sin antígeno de los grupos Terapia e Inmunogenicidad Pura. De manera similar, se consideró que una clona era positiva si el valor de la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ del grupo Inmunogenicidad Pura era menor que la proliferación inducida por la misma clona en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo Terapia menos las desviaciones estándar de la proliferación sin antígeno de los grupos Terapia e Inmunogenicidad Pura.

5.7 Inmunofenotipificación

Se recolectaron las células del bazo y del tumor proveniente de tres ratones por cada grupo de tratamiento al día 30 postimplante de la línea celular. Los eritrocitos se lisaron con la solución de lisis a 37 °C durante 7 min. Se tomó una mezcla de $2,5 \times 10^5$ células de cada grupo de tratamiento, pertenecientes a tres ratones por grupo, de forma tal que cada bazo y tumor individual aportó la misma cantidad de células a la mezcla. En caso de los ratones tratados con 23L y 23-WT fueron $2,5 \times 10^5$ células individuales por cada ratón. Las células se resuspendieron en PBS, 1 % de suero fetal bovino, 0,1 % de azida de sodio y los anticuerpos antiCD3-APCeFluor780, antiCD4-APC y antiCD8-PE. Otras $2,5 \times 10^5$ células se incubaron con los anticuerpos antiCD11b-AlexaFluor488, antiLy6G-PE, antiMHC-II-PECy5 y antiLy6C-PECy7. Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min y posteriormente, se lavó una vez con PBS, suero fetal bovino 1 %. Se centrifugó a 400 G durante 10 min y se resuspendieron las células en PBS, paraformaldehído al 1 %.

Todas las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune Azul-Rojo (Applied Biosystems) y se analizaron con el programa FlowJo X. Para el análisis de los linfocitos se realizó una gráfica en el que se seleccionaron los singletes. A partir de los singletes se realizó un gráfico de tamaño vs. granularidad, en donde se seleccionó la población de los linfocitos. A partir de la región seleccionada de los linfocitos se hizo un gráfico de granularidad vs. CD3 y se seleccionó la población CD3⁺. A partir de esta se hizo un

gráfico de CD4 vs. CD8 y se seleccionaron las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. Para el análisis de las G-MDSC se realizó una gráfica de FSC-H vs. FSC-A, en el que se seleccionaron los singletes. A partir de los singletes se realizó un gráfico de tamaño vs. granularidad, en el cual se seleccionó la población mieloide. A partir de ella, se realizó un gráfico de granularidad vs. CD11b y se seleccionó la población CD11b⁺. A continuación, se confeccionó un gráfico de MHC-II vs. CD11b y se seleccionó la población CD11b⁺MHC-II⁺. A partir de esta, se realizó un gráfico de Ly6C vs. Ly6G, en donde las G-MDSC son las células CD11b⁺MHC-II⁺Ly6C^{lo}Ly6G⁺.

5.8 Análisis de la predicción *in silico* de la unión a las moléculas de clase I del MHC

La predicción de unión a las moléculas de clase I del MHC se realizó el 14/05/2021 mediante el uso de la herramienta de análisis NetMHCpan (ver. 4.1) de IEDB (Reynisson et al., 2020).

5.9 Purificación y secuenciación del ADN plasmídico

Se inocularon 10 mL del medio de cultivo 2xYT suplementado con carbenicilina con una colonia de la cepa TG1 de *E. coli* que contenía el ADN plasmídico de interés. Se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm (Gyromax 737, Amerex Instruments, Inc.) durante 16-18 h. Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó el juego de reactivos *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los ADN plasmídicos se enviaron a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Genetic Analyzer ABI PRISM 3100, Applied Biosystems) para la obtención de la secuencia.

6 Resultados

6.1 Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de los tratamientos con las bibliotecas de epítomos variables derivadas de la región del péptido señal de Mucina 1

6.1.1 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con la biblioteca 9MUC1spL

Se procedió a evaluar el efecto antitumoral de la biblioteca 9MUC1spL con todo su repertorio de 8000 variantes del epítomo de Mucina 1. El grupo de ratones que se vacunó con 9MUC1spL presentó un área tumoral promedio significativamente inferior desde el día 23 postimplante en comparación con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Sin Tratamiento) (Figura 2A). Al final del experimento, al día 30 postimplante, el grupo de ratones que recibió como tratamiento a la biblioteca o a la secuencia silvestre del epítomo (9-WT) presentaron un promedio del área tumoral similar y significativamente inferior en comparación con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figura 2A). Sin embargo, no se observó una disminución significativa del área tumoral luego del tratamiento con 9MUC1spL en comparación con el tratamiento con 9-WT.

Debido a que el modelo murino de cáncer de mama genera de manera espontánea metástasis en los pulmones de los ratones se procedió a evaluar la presencia de los focos metastásicos luego de cada tratamiento al día 30 postimplante. Se observó una tendencia a la disminución del promedio de las macrometástasis en los pulmones de los ratones que se vacunaron con 9MUC1spL en comparación con los ratones tratados con 9-WT o con los que no recibieron tratamiento (Figura 2B). Estos resultados demuestran que el tratamiento con todo el repertorio de la biblioteca 9MUC1spL no tiene un efecto antitumoral superior al tratamiento con su secuencia silvestre. Por lo tanto, es necesario encontrar un tratamiento con base en variantes aisladas del repertorio de 9MUC1spL que tenga un efecto antitumoral superior al observado con el tratamiento con todo el repertorio de las 8000 variantes del epítomo de MUC1 contenidas en la biblioteca 9MUC1spL.

6.1.2 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con la biblioteca 23L

Previamente, se ha demostrado que las bibliotecas de epítomos variables que contemplaron los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4⁺, así como otros epítomos reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ redujeron significativamente el área tumoral y el número de las macrometástasis *in vivo* (Domínguez-Romero et al., 2020; Martínez-Cortés

et al., 2021). Por este motivo, se decidió evaluar el efecto antitumoral de una biblioteca de epítomos variables que comprendió la región completa del péptido señal de Mucina 1 de ratón (23L) que abarcó los primeros 23 residuos de la región amino terminal de MUC1 con 5 substituciones para una complejidad de $3,2 \times 10^6$ variantes de la secuencia silvestre (23-WT).

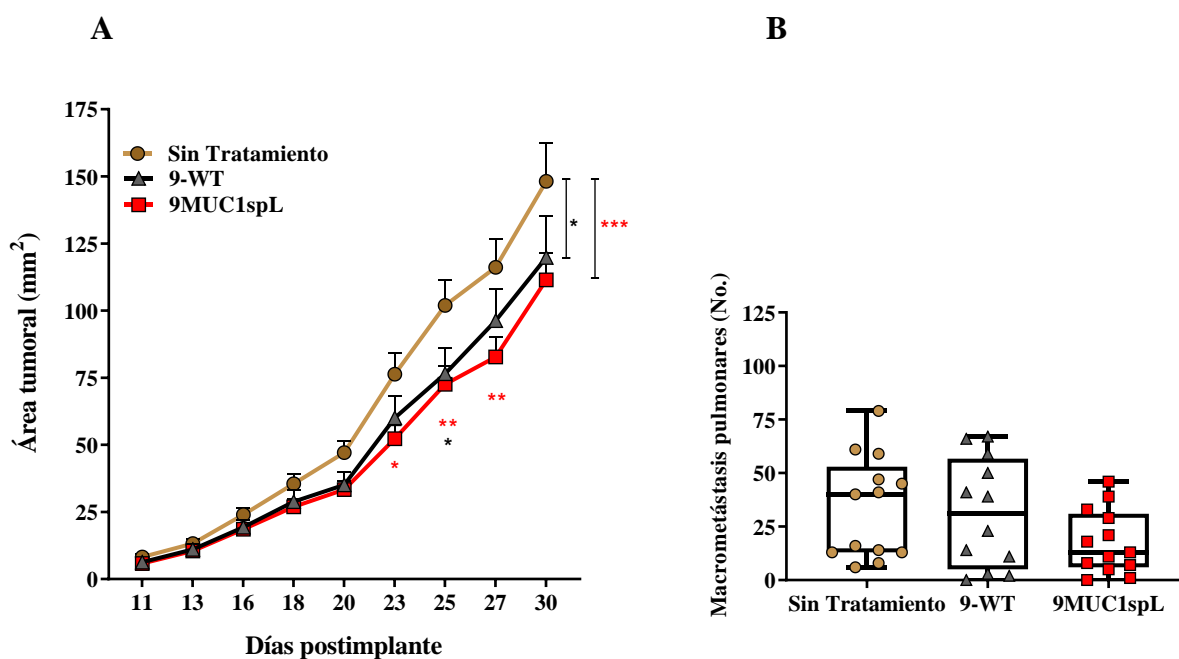


Figura 2: Evaluación del efecto antitumoral de la biblioteca de epítomos variables 9MUC1spL derivada del péptido señal de Mucina 1 de ratón. Ratones hembra de 5 a 6 semanas de edad se inocularon con 10^4 células de la línea celular 4T1. Al quinto día postimplante se vacunaron (s.c.) con 180 μ g del péptido sintético de interés y 180 μ g de poli I:C. A: El área tumoral se determinó por el producto de dos mediciones perpendiculares del tumor (alto x ancho) y se presenta como la media + error estándar de la media. B: Al día 30 postimplante los ratones se sacrificaron y se contaron las macrometástasis en los pulmones. Los resultados que se muestran corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. En A, $n = 17-18$ y B, $n = 12-13$. ANOVA de dos vías y una vía, comparación múltiple de Tukey en A y B, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

El tratamiento con todo el repertorio de 23L disminuyó significativamente el área tumoral de los ratones desde el día 25 postimplante (día 23, $p = 0,065$) en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento (Figura 3A). Al final del experimento al día 30 postimplante el grupo de ratones que recibió como tratamiento a la biblioteca 23L presentó un promedio del área tumoral significativamente inferior en comparación con el grupo de ratones que recibió como tratamiento a 23-WT o en comparación con el grupo

de ratones que no recibió tratamiento (Figura 3A). Por otra parte, no se observó una disminución significativa en el promedio de las macrometástasis pulmonares luego del tratamiento con la biblioteca 23L en comparación con el tratamiento con 23-WT o con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figura 3B).

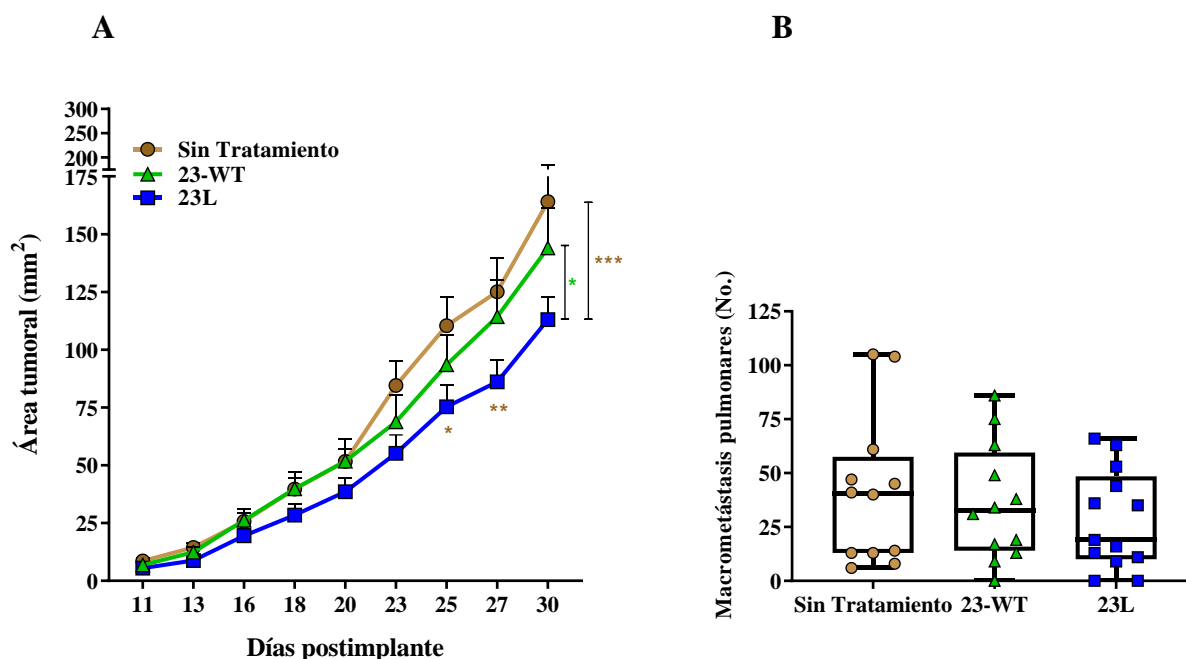


Figura 3: Evaluación del efecto antitumoral de la biblioteca de epítomos variables 23L derivada del péptido señal de Mucina 1 de ratón. Ratones hembra de 5 a 6 semanas de edad se inocularon con 10^4 células de la línea celular 4T1. Al quinto día postimplante se vacunaron (s.c.) con 180 μ g del péptido sintético de interés y 180 μ g de poli I:C. A: El área tumoral se determinó por el producto de dos mediciones perpendiculares del tumor (alto x ancho) y se presenta como la media + error estándar de la media. B: Al día 30 postimplante los ratones se sacrificaron y se contaron las macrometástasis en los pulmones. Los resultados que se muestran corresponden al promedio de 2 experimentos independientes. En A, $n = 12-14$ y B, $n = 12-13$. ANOVA de dos vías y una vía, comparación múltiple de Tukey en A y B, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.2 Obtención de las variantes del epítopo de interés a partir del repertorio de la biblioteca 9MUC1spL

6.2.1 Construcción de la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso

El primer paso para la obtención de las variantes del epítopo a partir de 9MUC1spL fue construir la biblioteca mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso M13. Esta técnica permite de una manera rápida el tamizaje de diferentes clonas con un

fenotipo de interés y, además, permite conocer sus genotipos (Tundidor et al., 2020). Primeramente, se purificó el vector fagémido pG8SAET que contiene el gen que codifica a la proteína VIII de la cápside del bacteriófago (Figura 1) y se comprobó que la calidad del ADN resultante de la purificación fue la adecuada. Luego de las digestiones, el ADN migró en una sola banda correspondiente a un vector lineal no degradado (Figura 4A). Antes de llevar a cabo las clonaciones se realizó una prueba de ligación del vector consigo mismo y con un inserto. Cuando se electroporaron las células de *E. coli* con las reacciones de ligación se obtuvo que el número de colonias provenientes del vector autoligado fue menor al 10 % con respecto a la reacción de ligación con un inserto. Este valor fue considerado como adecuado y, por lo tanto, se continuó con la obtención del inserto a clonar que codifica a la biblioteca 9MUC1spL.

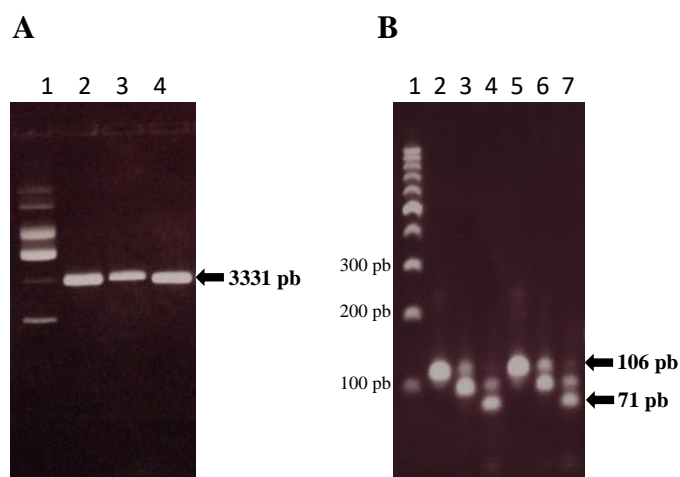


Figura 4: Construcción de la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentosos M13. A: Preparación del vector fagémido pG8SAET. Carril 1: vector pG8SAET purificado sin digerir; 2: digestión con la enzima NcoI; 3: segunda ronda de digestión con NcoI y 4: doble digestión con la enzima BamHI. B: Obtención del ADN que codifica para la biblioteca 9MUC1spL (carriles 5-7) y su secuencia silvestre 9-WT (carriles 2-4). Carril 1: patrón de peso molecular; 2: producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 9muc1spn, 5'DAMP y 3'DAMP; 3 y 6: digestión con NcoI; 4 y 7: digestión con BamHI del producto previamente digerido con NcoI y 5: producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 9muc1spl, 5'DAMP y 3'DAMP. Electroforesis de ADN en geles de agarosa, en A al 0,8 % y en B al 2 %.

Se ensamblaron y amplificaron mediante PCR los oligonucleótidos correspondientes para cada una de las dos construcciones, 9MUC1spL y 9-WT. En ambos casos el producto de la reacción fue un fragmento de ADN único con el tamaño esperado de 106 pb (Figura 4B). A continuación, se procedió a digerir con las mismas enzimas de restricción que se

digirió el vector y el producto doble digerido tuvo el tamaño menor esperado de 71 pb (Figura 4B). Una vez clonado el inserto se determinó que la diversidad de la biblioteca 9MUC1spL construida mediante la tecnología de presentación en bacteriófago M13 fue de 66 000, lo que supera la diversidad teórica de 8000. Por lo tanto, cada variante está representada al menos una vez dentro de la biblioteca. Como control de la calidad de las clonaciones realizadas se secuenciaron 4 clonas elegidas al azar del repertorio de 9MUC1spL y la clona correspondiente a la secuencia silvestre. Las 5 clonas tuvieron el inserto deseado en el marco de lectura correcto en el vector pG8SAET. Además, las 4 clonas de la biblioteca 9MUC1spL tenían aleatorizadas las posiciones que estaban incluidas en el diseño de la biblioteca (Tabla 2). En cada una de las posiciones aleatorizadas se observó un residuo aminoacídico distinto al que está presente en la secuencia silvestre, por lo que la aleatorización fue total en estas posiciones. De igual manera, la clona correspondiente a 9-WT tuvo los residuos aminoacídicos de la secuencia silvestre del epítipo de MUC1 (Tabla 2). Adicionalmente, se obtuvieron 32 clonas aisladas de la biblioteca 9MUC1spL y se determinó mediante PCR que solamente 5 no contenían el inserto para una eficiencia de la clonación del 84 % (Apéndice 1).

Tabla 2: Secuencias de las clonas de la biblioteca 9MUC1spL y de su respectiva secuencia silvestre

Nombre	Secuencia
Biblioteca 9MUC1spL	PGXRXPFXL
9MUC1spL-13	PGNRNPFVL
9MUC1spL-14	PGR RTPFSL
9MUC1spL-15	PGVRLPFL
9MUC1spL-16	PGGRYPFAL
9-WT	PGIRAPFFL

X: Representa las posiciones aleatorizadas en el diseño de la biblioteca 9MUC1spL. Resaltados en color negro se muestran los residuos aminoacídicos que son diferentes a la secuencia silvestre del epítipo del péptido señal de Mucina 1.

6.2.2 Selección de las variantes del epítipo de la biblioteca 9MUC1spL mediante ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8⁺

Una vez construida la biblioteca 9MUC1spL mediante la tecnología de presentación en bacteriófago filamentoso se procedió a aislar 84 clonas de su repertorio. Para la identificación de las variantes del epítipo de interés se realizaron ensayos de proliferación con linfocitos T CD8⁺ cultivados individualmente con cada una de las variantes. Los

linfocitos T CD8⁺ se obtuvieron de los bazos de dos grupos de ratones inmunizados con el repertorio completo de la biblioteca 9MUC1spL. A uno de los dos grupos de ratones se le inocularon 10⁴ células de la línea celular 4T1 5 días previos a la vacunación (Terapia) y al segundo grupo no se le inoculó la línea celular (Inmunogenicidad Pura). También se emplearon dos grupos de ratones sin inmunización que sirvieron para determinar el fondo del valor de la proliferación (Intacto y Control Implante). El grupo Control Implante se inoculó con la línea celular 4T1 de la misma manera que el grupo Terapia y el grupo Intacto no se inoculó con la línea celular ni se inmunizó. De las 84 clonas evaluadas, 46 (54,8 %) indujeron una proliferación mayor en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo Terapia en comparación con los provenientes del grupo Inmunogenicidad Pura, a las que se llamaron clonas positivas (Figura 5). Por otra parte, 7 clonas (8,3 %) indujeron una proliferación menor en los linfocitos T CD8⁺ del grupo Terapia en comparación con los provenientes del grupo Inmunogenicidad Pura, a las que se llamaron clonas negativas. Se decidió descartar de futuros análisis a 9 clonas: 12, 21, 24, 45, 46, 50, 57, 72 y 84 debido a que no indujeron la proliferación en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de los grupos Inmunogenicidad Pura y Terapia. También se decidió descartar del análisis a otras 25 clonas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 25, 36, 37, 38, 42, 47, 48, 49, 52, 61, 64, 68, 73 y 81 debido a que presentaron un fondo de proliferación alto en los grupos no inmunizados. De las 50 clonas restantes se seleccionaron las 8 clonas positivas y las 5 clonas negativas con comportamiento más extremo para confirmar este resultado en un segundo ensayo de proliferación independiente. Se añadieron las clonas 23, 9 y 82 a las 5 clonas negativas para evaluar un total de 8 clonas.

6.2.3 Confirmación de las variantes del epítipo seleccionadas de la biblioteca 9MUC1spL mediante ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8⁺

Se realizó un segundo ensayo de proliferación independiente en las mismas condiciones experimentales. Como era de esperada, las 8 clonas positivas y 4 de las 5 clonas negativas indujeron porcentajes proliferación en los linfocitos T CD8⁺ de manera similar al primer experimento (Figuras 6A y 6B). Por lo tanto, se eligieron 4 clonas tanto negativas como positivas para agruparlas en dos mezclas de variantes debido a que fue el número de clonas en las se tuvo confirmación en ambos experimentos de proliferación (Figuras 5 y 6). A la mezcla de las 4 clonas positivas se le denominó Selección Positiva y se conformó con las clonas 20, 28, 30 y 40. Por otra parte, a la mezcla de las 4 clonas negativas se le denominó Selección Negativa e incluyó a las clonas 22, 39, 59 y 62.

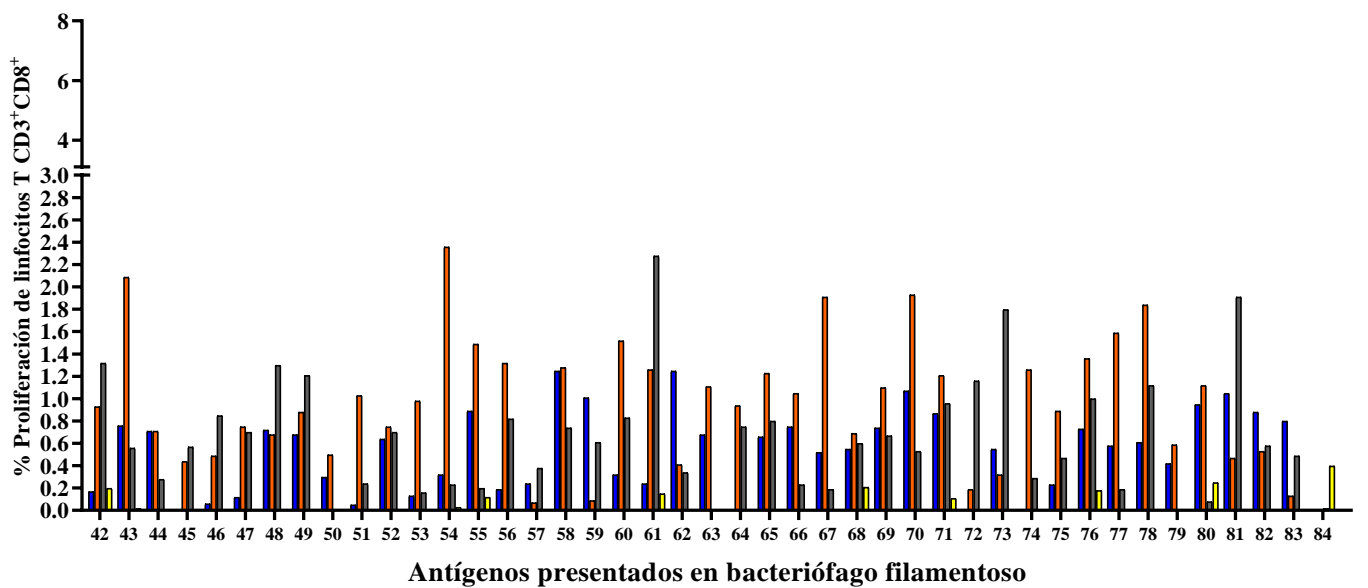
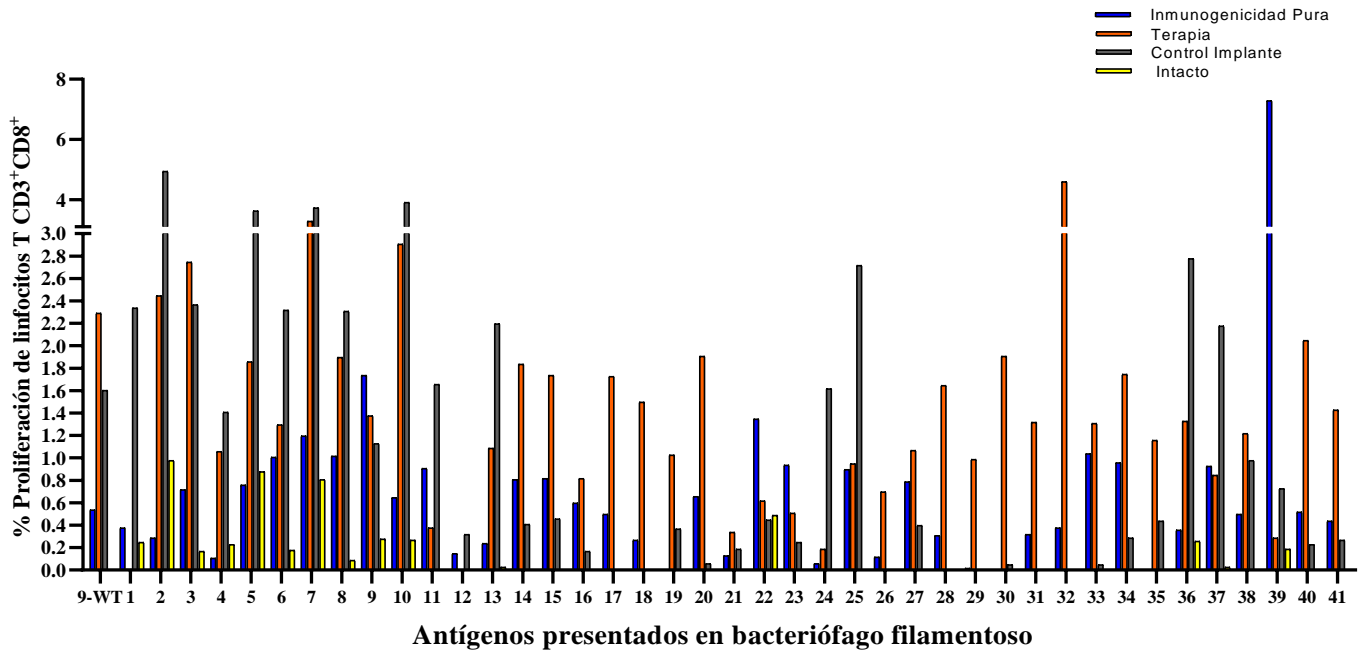


Figura 5: Proliferación de los linfocitos T CD8⁺ inducida por las clonas de la biblioteca 9MUC1spL. Ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad se inmunizaron (s.c.) con 180 μ g del péptido de la biblioteca 9MUC1spL y 180 μ g de poli I:C (Inmunogenicidad Pura y Terapia) y/o se implantaron con 10^4 células de la línea celular 4T1 (Terapia y Control Implante). En el grupo Terapia, la vacunación se realizó 5 días posteriores al implante tumoral. Los ratones se sacrificaron 10 días posteriores a la inmunización o a los 15 días posteriores al implante tumoral. $2,5 \times 10^5$ células de bazo teñidas con CFSE (1 μ M) provenientes de tres ratones por grupo se cultivaron durante 72 h con cada uno de los antígenos presentados en bacteriófago ($1,5 \times 10^9$ ufc). Se determinó el valor de la proliferación de los linfocitos T CD3⁺CD8⁺ de bazo con cada una de las 84 clonas del repertorio de la biblioteca 9MUC1spL de Mucina 1 (PGXRXPFXL). Las células se teñieron con antiCD3-APCeFluor780, 7AAD y antiCD8-PE.

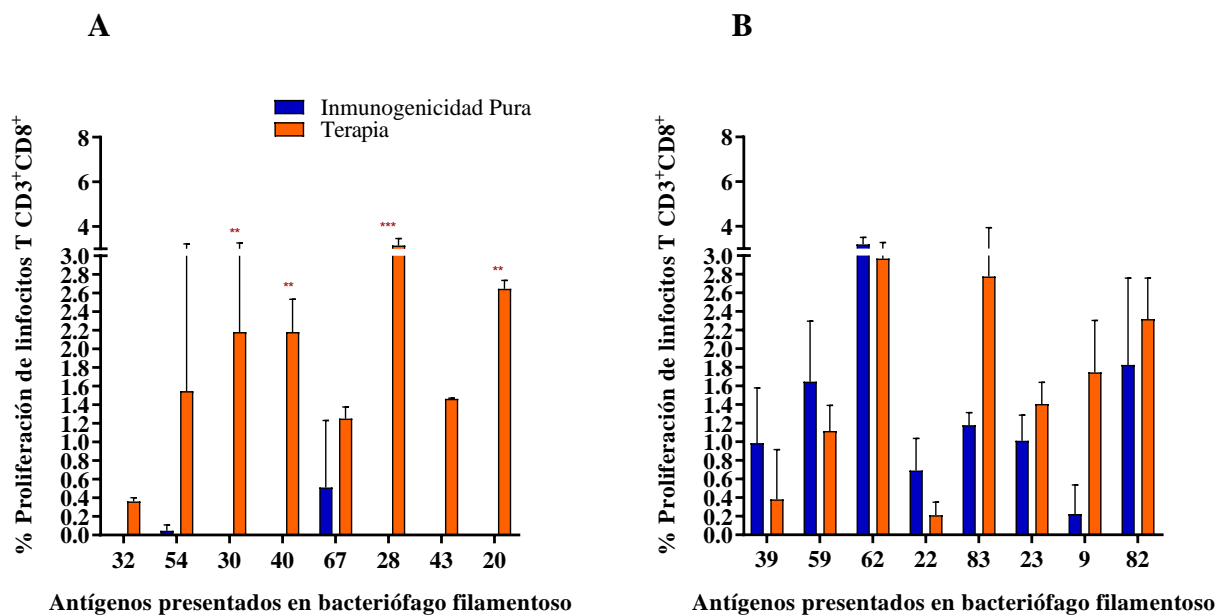


Figura 6: Proliferación inducida por las clonas de la biblioteca 9MUC1spL. Ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad se inmunizaron (s.c.) con 180 μ g del péptido de la biblioteca 9MUC1spL y 180 μ g de poli I:C (Inmunogenicidad Pura). Otro grupo de ratones se implantó con 10^4 células de la línea celular 4T1 5 días previos a la vacunación (Terapia). Los ratones se sacrificaron 10 días posteriores a la inmunización. $2,5 \times 10^5$ células de bazo teñidas con CFSE (1 μ M) provenientes de dos ratones por grupo se cultivaron durante 72 h con cada uno de los antígenos presentados en bacteriófago ($1,5 \times 10^9$ ufc). Se determinó el valor de la proliferación en los linfocitos T CD3⁺CD8⁺ con cada una de las 8 clonas positivas (A) y negativas (B) del repertorio de la biblioteca 9MUC1spL de Mucina 1 (PGXRXPFXL). Las células se tiñeron con antiCD3-APCeFluor780, 7AAD y antiCD8-PE. ANOVA de dos vías, comparación múltiple de Sidak, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Previamente, antes de realizar los ensayos de proliferación se verificó que todas las 84 clonas iniciales tenían el inserto que codifica a las variantes del epítipo de MUC1 en el vector pG8SAET (Apéndice 2). Sin embargo, se desconocían aún las substituciones dentro del epítipo de MUC1 en las 8 clonas de las Selecciones Negativa y Positiva. Adicionalmente, se ignoraba si el inserto que codifica a las variantes del epítipo estaba clonado correctamente en el vector pG8SAET. Por este motivo, se procedió a secuenciar las 8 clonas y se verificó que todas tenían el epítipo de MUC1 en el marco de lectura correcto. Asimismo, eran diferentes entre sí y se encontraban aleatorizadas en las posiciones 3, 5 y 8 del epítipo tal y como fue el diseño de la biblioteca 9MUC1spL (Tabla 3). Sorprendentemente, dos de las clonas tenían aleatorizado un residuo fuera de las posiciones incluidas en el diseño de la biblioteca (Tabla 3). Probablemente, esto se debió a subproductos de la síntesis de los oligonucleótidos que posiblemente se seleccionaron debido a que le confirió una propiedad particular al epítipo.

Tabla 3: Clonas de la biblioteca 9MUC1spL agrupadas en las Selecciones Negativa y Positiva

Clona	Selección Negativa	Clona	Selección Positiva
22	PGRRKPFKL	20	PGMRGPFPL
39	PGWRLPFWL	28	PGQRNPFNL
59	PGRRLPFWL	30	PGTRLPFPL
62	PGNRLSFCL	40	PGGCQPFRL

En negro se muestran los residuos que son diferentes a la secuencia silvestre del péptido señal de MUC1.

6.3 Caracterización de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva

6.3.1 Antigenicidad de las clonas en ausencia de inmunización

Una vez seleccionado el conjunto de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva se procedió a caracterizar a estas variantes con el propósito de encontrar el mecanismo de acción por el que inducen diferentemente la proliferación en los linfocitos T CD8⁺. Primeramente, con el fin de determinar si las clonas negativas son reconocidas por los linfocitos T CD8⁺ involucrados en la respuesta natural contra el tumor, se evaluó la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ provenientes de un grupo de ratones sin inmunización, pero implantados con la línea 4T1 (Control Implante) en presencia de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva. Se observó una tendencia en la que las 4 clonas de la Selección Negativa indujeron en promedio una proliferación mayor en los linfocitos T CD8⁺ en comparación con las 4 clonas de la Selección Positiva ($p = 0,09$) (Figura 7).

Por otra parte, el valor de la proliferación inducido en los linfocitos T CD8⁺ por las 4 clonas de la Selección Negativa fue significativamente superior al obtenido en las mismas células provenientes de un grupo de ratones no implantados con el tumor ni inmunizados (Intacto) estimuladas tanto con las 4 clonas de la Selección Negativa como de la Selección Positiva (Figura 7). Como era esperado, se observó una tendencia de un valor mayor de la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo de ratones implantados con el tumor en presencia tanto de las clonas de las Selecciones Negativa como Positiva en comparación con la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo Intacto (Figura 7).

6.3.2 Predicción de unión de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva a las moléculas de clase I del MHC

Aun cuando la estrategia de la biblioteca 9MUC1spL no fue aumentar la unión a las moléculas de clase I del MHC, uno de los mecanismos por el cual las clonas seleccionadas pueden inducir una proliferación de manera diferencial en los linfocitos T CD8⁺ es mediante la modificación de la unión a estas moléculas. Por este motivo, se predijo la unión a las diferentes MHC-I del ratón BALB/c (H-2^d) para cada una de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva (Figura 8). Las clonas que conforman las dos selecciones en promedio tuvieron una tendencia a una peor predicción de unión a las moléculas de clase I del MHC en comparación con la secuencia silvestre del epítipo. Además, no se observó una diferencia significativa en la unión a las moléculas de clase I del MHC cuando se comparó el promedio de las Selecciones Negativa y Positiva para cada una de las MHC-I (Figura 8).

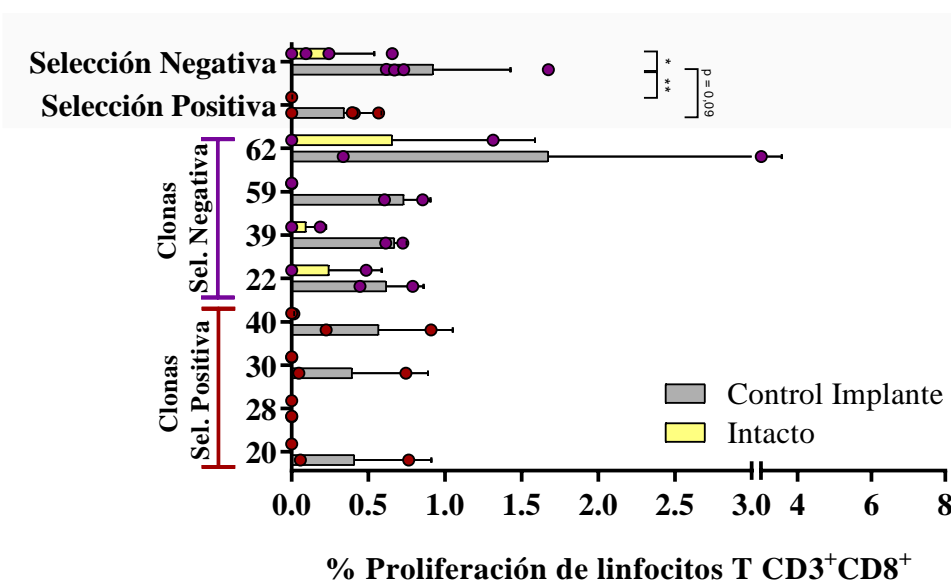


Figura 7: Antigenicidad de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva en ausencia de inmunización. Proliferación de los linfocitos T CD8⁺ inducida por las 8 clonas agrupadas en las Selecciones Negativa y Positiva provenientes de la biblioteca de epítipos variables de MUC1 de ratón, 9MUC1spL (PGXRXPFXL). Ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad se inocularon con 10⁴ células de la línea celular 4T1 (Control Implante) o se dejaron sin inocular (Intacto). Los ratones se sacrificaron 15 días posteriores al implante tumoral (n = 5). 2,5 x 10⁵ células de bazo teñidas con CFSE (1 μM) se cultivaron durante 72 h con cada uno de los antígenos presentados en bacteriófago (1,5 x 10⁹ ufc). Las células se tiñeron con antiCD3-APCeFluor780, 7AAD y antiCD8-PE. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. ANOVA de dos vías, comparación múltiple de Tukey, *p < 0,05, **p < 0,01.

6.4 Evaluación de las poblaciones inmunitarias luego del tratamiento con las bibliotecas de epítomos variables de Mucina 1

Los tumores generados a partir de las células 4T1 se caracterizan por la acumulación de las células supresoras derivadas de mieloide de tipo granulocítica, que tienen un alto poder de inhibición de la respuesta inmunitaria celular, principalmente en el bazo de los ratones (Baumann et al., 2020). Por lo tanto, como parte de la caracterización del efecto antitumoral de las bibliotecas de epítomos variables se evaluó la presencia de esta población luego de cada tratamiento con cada una de las BEV generadas a partir de la región del péptido señal de MUC1 (Figura 9).

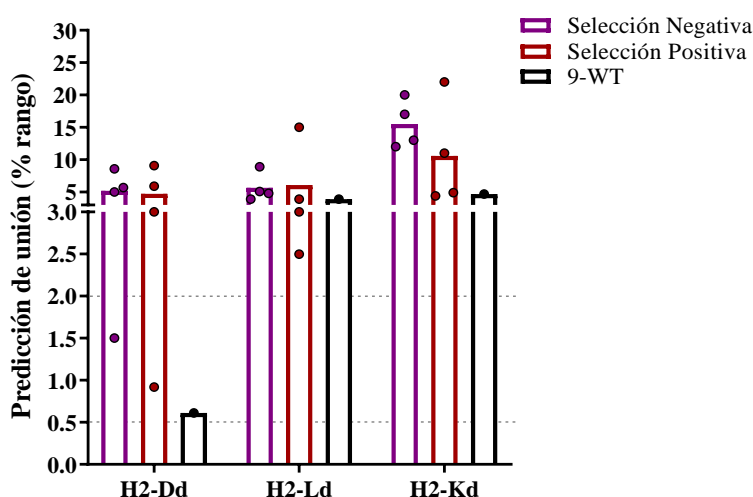


Figura 8: Predicción de unión de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva a las moléculas de clase I del MHC. La predicción de unión se realizó mediante el uso de la herramienta de análisis NetMHCpan (versión 4.1) de IEDB. Se muestra el % del rango percentil para cada una de las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad del ratón BALB/c (H-2^d). Las líneas punteadas indican unión fuerte (% rango < 0,5) y débil (0,5 < % rango < 2), respectivamente.

Se observó una tendencia a una disminución del porcentaje de las G-MDSC luego del tratamiento con 9MUC1spL y 23L en los bazos de los ratones en comparación con el tratamiento con las respectivas secuencias silvestres (9-WT y 23-WT) o con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figuras 9A y 9C). Al analizar las G-MDSC infiltrantes del tumor, se observó una tendencia a una disminución de estas células luego del tratamiento con 9MUC1spL y con 9-WT en comparación con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figura 9B). Contradictoriamente, se observó una tendencia a un

aumento del porcentaje de las G-MDSC dentro de los tumores de los ratones tratados tanto con 23L, así como con su secuencia silvestre, 23-WT, en comparación con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figura 9D).

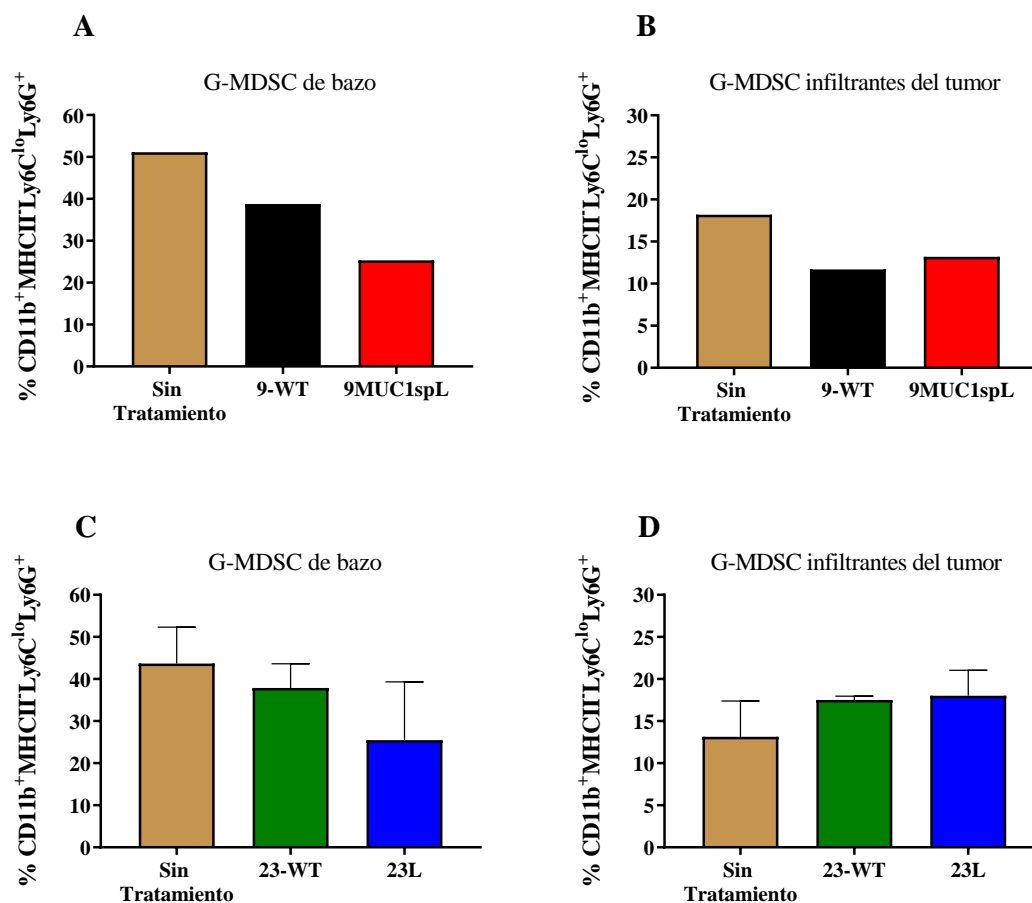


Figura 9: Cuantificación de las células supresoras derivadas de mieloides de tipo granulocíticas (G-MDSC) luego del tratamiento con las bibliotecas 9MUC1spL y 23L. Ratones hembra BALB/c se inocularon con 10^4 células 4T1 y se inmunizaron (s.c.) 5 días posteriores con 180 μ g del adyuvante poli I:C y 180 μ g del péptido sintético correspondiente. $2,5 \times 10^5$ células provenientes de los bazos (A y C) y de los tumores (B y D) de tres ratones por grupo al día 30 postimplante de la línea celular se incubaron con los anticuerpos antiCD11b-AlexaFluor488, antiMHCII-PECy5, antiLy6G-PE y antiLy6C-PECy7 para determinar la población CD11b⁺MHC-II⁺Ly6C^{lo}Ly6G⁺ (G-MDSC). Los datos que se muestran corresponden al porcentaje de las células G-MDSC con respecto a las células individuales totales adquiridas en el citómetro. Los datos que se muestran corresponden a un solo experimento.

Adicionalmente, se cuantificó la población de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes del tumor luego de cada tratamiento (Figura 10). Contradictoriamente a lo esperado, se observó una tendencia a una disminución del porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ luego del tratamiento con 9MUC1spL (Figuras 10A y 10B). En cambio, se observó una

tendencia a un mayor porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ luego del tratamiento con la biblioteca 23L en comparación con el tratamiento con 23-WT y con el grupo de ratones que no recibió tratamiento (Figuras 10C y 10D). Se observó una tendencia a un aumento del porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los bazos de los ratones luego de los tratamientos con las bibliotecas 9MUC1spL y 23L, así como con sus respectivas secuencias silvestres, 9-WT y 23-WT (Apéndice 3).

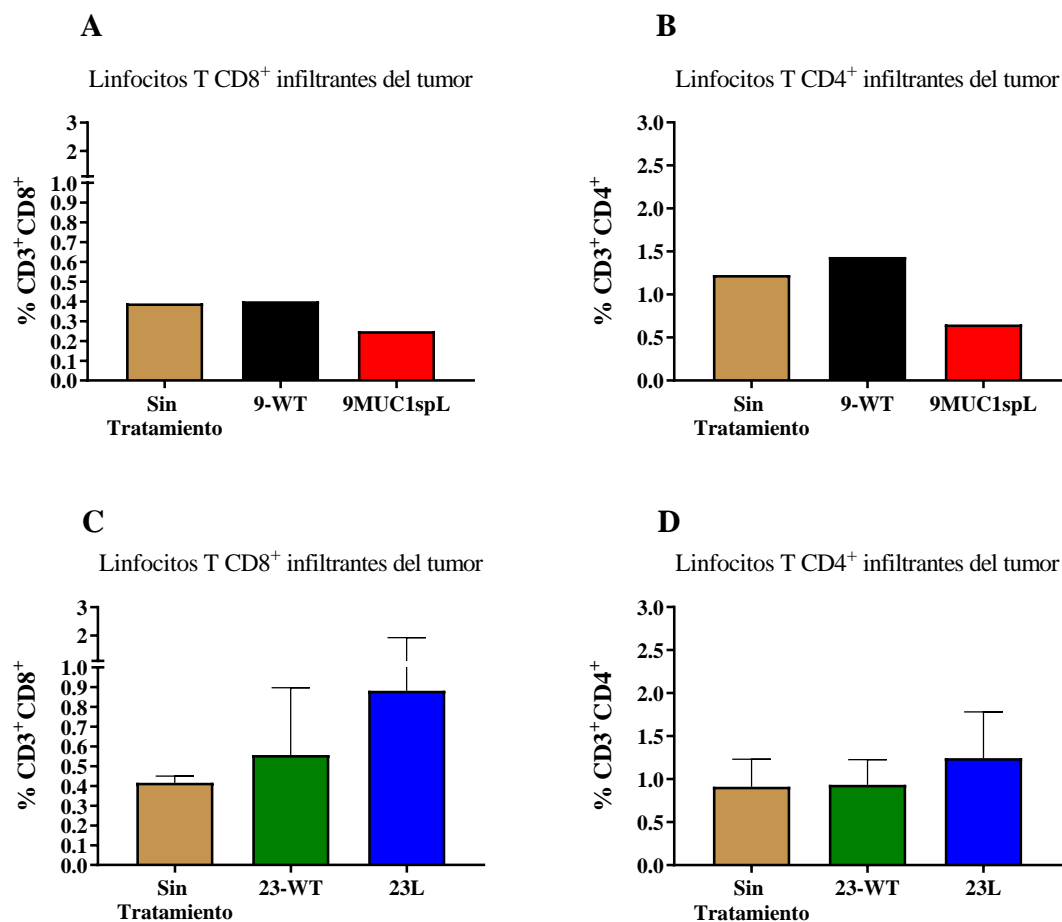


Figura 10: Cuantificación de los linfocitos infiltrantes del tumor luego del tratamiento con las bibliotecas 9MUC1spL y 23L. Ratones hembra BALB/c se inocularon con 10⁴ células 4T1 y se inmunizaron (s.c.) 5 días posteriores con 180 µg del adyuvante poli I:C y 180 µg del péptido sintético correspondiente. 2,5 x 10⁵ células, provenientes de los tumores de tres ratones por grupo al día 30 postimplante de la línea celular, se incubaron con los anticuerpos antiCD3-APCeFluor780, antiCD4-APC y antiCD8-PE. Los datos se muestran como el porcentaje de las células CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺ con respecto a las células individuales totales adquiridas en el citómetro. Los datos que se muestran corresponden a un solo experimento.

7 Discusión

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se han informado los efectos antitumorales de diferentes BEV derivadas de varios TAA y con repertorios de distinta complejidad (Servín-Blanco et al., 2018). Además, las BEV han mostrado ser más eficaces que el tratamiento con sus respectivas secuencias silvestres en el modelo de 4T1 (Domínguez-Romero et al., 2020; Martínez-Cortés et al., 2021). La idea racional detrás de la estrategia de las bibliotecas de epítomos variables es que las sustituciones dentro del epítomo aumentan la probabilidad de que sea reconocido como un epítomo extraño (Galloway et al., 2019; Driscoll et al., 2020). Esto se basa en la promiscuidad del TCR y la expansión del repertorio de los epítomos que un linfocito T puede reconocer después del proceso de activación (Amrani et al., 2001; Wooldridge et al., 2012). De esta manera, después de la activación con las variantes del epítomo de las BEV, los linfocitos T pueden reconocer específicamente las variantes del epítomo que potencialmente pueden aparecer durante el desarrollo natural de la enfermedad. Además, pueden reconocer de manera cruzada el epítomo silvestre que es el blanco más probable en las células tumorales (Martínez-Cortés et al., 2021).

Previamente, se han empleado por otros grupos de trabajo dos estrategias similares que utilizan epítomos modificados para aumentar la inmunogenicidad del epítomo y son los ligandos peptídicos alterados y los xenoantígenos (Jones et al., 2019; Smith et al., 2021). Estas estrategias junto con las BEV ofrecen en conjunto métodos para romper la tolerancia hacia los epítomos silvestres que son reconocidos por los linfocitos T autorreactivos con una afinidad baja a media. Sin embargo, los ligandos peptídicos alterados y los xenoantígenos emplean una sola variante del epítomo en lugar de múltiples variantes como es el caso de las BEV que pueden aumentar la probabilidad de inducir una respuesta antitumoral más eficaz (Marijt et al., 2021; He et al., 2021).

En este trabajo demostramos el efecto antitumoral de dos BEV derivadas de Mucina 1 en el modelo murino de cáncer de mama generado con la línea celular 4T1. Para la confección de las bibliotecas se utilizó la región del péptido señal de esta proteína. Las ventajas del empleo de los epítomos provenientes de los péptidos señales en el desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer es que se unen promiscuamente a los diferentes haplotipos de las moléculas de clase I y II del MHC (Kovjazin et al., 2011; Kovjazin y Carmon, 2014). Además, se ha demostrado que su secuencia hidrofóbica puede ser clave

en la activación de los linfocitos T (Chowell et al., 2015). Por otra parte, los epítomos provenientes de los péptidos señales son considerados neoantígenos debido a que se presentan exclusivamente en las MHC-I de las células tumorales con afectaciones en la vía de procesamiento y presentación de los antígenos, por ejemplo, en el proteosoma y en TAP (Hage et al., 2008; Marijt y van Hall, 2020). Normalmente, las afectaciones en la vía de procesamiento y presentación de los antígenos se encuentran en las células tumorales como mecanismos vinculados a la evasión de la respuesta inmunitaria (Garrido et al., 2020). Por este motivo, una respuesta inmunitaria hacia estos epítomos contrarrestaría los mecanismos de escape tumoral (Marijt et al., 2021). En el caso particular del péptido señal de MUC1 humano, este demostró contener epítomos más inmunogénicos que los epítomos que provienen de la región VNTR, que es la que más se ha empleado en la inmunoterapia contra el cáncer (Kovjazin et al., 2011). Adicionalmente, se ha demostrado que, debido a procesos de corte y empalme alternativos, MUC1 tumoral no siempre contiene la región VNTR (Zhang et al., 2013). Por este motivo, una respuesta inmunitaria citotóxica específica hacia los epítomos de esta región generada por una vacunación no encontraría a sus blancos en todas las células tumorales (Khan et al., 2021). Las ventajas que presentan los epítomos provenientes del péptido señal de MUC1 conllevó a que se desarrollara una vacuna a partir del péptido señal completo de MUC1 que se evaluó en ensayos clínicos hasta la fase 2 para el tratamiento de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple (Carmon et al., 2015).

En los resultados mostrados en la Figura 2 se observó una disminución parcial del área tumoral luego del tratamiento con la biblioteca 9MUC1spL, de manera similar a lo observado luego del tratamiento con su secuencia silvestre, lo que se debe muy probablemente a la naturaleza de neoantígeno del epítomo silvestre (Garrido et al., 2020). Aunque la secuencia silvestre forma parte del repertorio de 9MUC1spL, no creemos que el efecto observado con la inmunización con 9MUCspL se deba a una respuesta hacia la secuencia silvestre debido a que se encuentra diluida dentro de la dosis que se empleó con 9MUC1spL (1/8000). Esto indica que existen variantes dentro del repertorio que son inmunogénicas e inducen una respuesta inmunitaria antitumoral. Por otra parte, el tratamiento con 9MUC1spL tuvo una tendencia a la disminución de las macrometástasis pulmonares a los 30 días posteriores al implante tumoral. Previamente, se comprobó que la incorporación de los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ en las BEV potencian su efecto antitumoral (Domínguez-Romero et al., 2020; Martínez-Cortés et al.,

2021). Por este motivo, se generó una BEV que abarcó toda la región del péptido señal de MUC1 (23L). Contradictoriamente, la biblioteca 23L no inhibió aún más el área tumoral ni la formación de las macrometástasis pulmonares en comparación con el tratamiento con la biblioteca de 9 residuos, 9MUC1spL (Figura 3). Esto concuerda con un trabajo reciente, en donde se demostró que un epítipo inmunogénico de 9 residuos no es presentado de forma cruzada eficientemente por las células dendríticas cuando se usó un péptido sintético largo derivado de un péptido señal (Marijt et al., 2021). Este trabajo informa por primera vez la construcción y la evaluación del efecto antitumoral de dos BEV derivadas del péptido señal de MUC1 que contiene epítomos que son considerados neoantígenos.

La evaluación de las metástasis luego del tratamiento con las bibliotecas de epítomos variables es un parámetro importante ya que las muertes de las pacientes con cáncer de mama en estadio IV se atribuyen a las metástasis (den Brok et al., 2016). Según nuestros conocimientos, este es el primer trabajo que informa los resultados de las metástasis en el modelo con 4T1 cuando se utiliza una inmunoterapia activa exclusivamente contra MUC1 (Jiménez-Chávez et al., 2021). Descartamos de este análisis los trabajos que utilizan la línea celular 4T1 transfectada con MUC1 debido a que reflejan una condición artificial en el tumor (Moase et al., 2001). La cascada metastásica de los tumores generados con las células 4T1 comienza en la primera semana luego de la inoculación de la línea celular, por lo tanto, es difícil inhibir completamente la formación de las metástasis (Ouzounova et al., 2017). Esto significa que la colonización del tejido pulmonar por las células tumorales ya se está llevando a cabo desde que se inmunizaron los ratones a los 5 días posteriores a la inoculación de las células 4T1. Esto sugiere que el tratamiento con 9MUC1spL es capaz de controlar la formación de los nuevos focos metastásicos o inhibir su crecimiento hasta el nivel macroscópico (Figura 2B).

Aun cuando no se determinó el mecanismo por el cual la biblioteca 9MUC1spL inhibió mejor la formación de las macrometástasis, nosotros consideramos que la tendencia a la reducción de las G-MDSC en los bazos y en los tumores de los ratones pudo haber influido (Figura 9). El modelo de 4T1 se caracteriza por una acumulación de las células G-MDSC y se ha demostrado que las que se encuentran en el bazo impiden con mayor eficacia la actividad efectora de los linfocitos T en comparación con las G-MDSC que se encuentran fuera de este órgano (Alshetaiwi et al., 2020). Por este motivo, la disminución del porcentaje de las G-MDSC que se observó en los bazos luego de los tratamientos con

9MUC1spL y 23L probablemente influyó en el aumento del porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ observados en este mismo órgano (Apéndice 3). Se ha demostrado que las G-MDSC expresan MUC1, por lo tanto, el reconocimiento y eliminación de estas células por los linfocitos T CD8⁺ activados con 9MUC1spL ofrece un posible mecanismo para la disminución observada luego del tratamiento con la BEV (Sahraei et al., 2021). Contradictoriamente, los TIL estaban disminuidos en los ratones tratados con 9MUC1spL, lo que indica que en la respuesta celular no solo influye el número celular sino también el estado efector de las células (Figura 10). Aunque nosotros no evaluamos la actividad efectora de los TIL luego del tratamiento con 9MUC1spL creemos que probablemente tengan una función efectora superior a los TIL generados en el grupo de ratones sin tratamiento.

En el diseño de la biblioteca 9MUC1spL se eligieron 3 posiciones dentro del epítipo para hacer las sustituciones, diferentes de las posiciones 2 y 9 involucradas en el anclaje a las moléculas de clase I del MHC. La leucina de la posición 9 es la óptima para el anclaje a cada una de las 3 moléculas de clase I del MHC. Por otra parte, la glicina en la posición 2 del epítipo es la óptima que se ha descrito para el anclaje a la molécula H-2D, pero no para las otras dos restantes moléculas, tal y como se observó en las predicciones de unión a las diferentes MHC-I de la Figura 8 (Capietto et al., 2020). Aunque las sustituciones de los residuos subóptimos de anclaje por los ideales han demostrado aumentar la afinidad a la molécula de clase I, con esta estrategia también se ha descrito que se pueden introducir cambios conformacionales del complejo péptido-MHC que guían a la activación de un repertorio de linfocitos T distintos a lo que lo hace la secuencia silvestre (Lazoura et al., 2006; Madura et al., 2015; Smith et al., 2021). Por este motivo, nos resultó más interesante modificar solo los residuos centrales que potencialmente están en contacto con los TCR de los linfocitos T (Oliveira et al., 2021).

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se aleatorizó con diferentes números de posiciones un epítipo de 9 residuos que variaron de 2 a 5 sustituciones y se observó que a medida que aumentaba el número de sustituciones aumentaba la inmunogenicidad de la BEV (Pedroza-Roldan et al., 2009). Aumentar la inmunogenicidad del epítipo con un mayor número de residuos aleatorizados puede derivar en un mayor riesgo de perder el reconocimiento por la secuencia silvestre con posibles reacciones *off-target* no deseadas en el tratamiento de los pacientes con tumores (Linette et al., 2013; Bentzen et al., 2018). Actualmente, es difícil predecir sin estudios experimentales previos cuáles residuos

dentro de un epítopo ni por cuáles aminoácidos se pueden substituir sin afectar el reconocimiento por el epítopo silvestre (Bentzen et al., 2018; Galloway et al., 2019). Nosotros elegimos las posiciones 3, 5 y 8 para la generación de la biblioteca 9MUC1spL debido a que potencialmente son los que están en contacto con los TCR. Estas tres posiciones han sido utilizadas previamente para la generación de una BEV a partir del TAA OFA/iLRP que demostró aumentar el efecto antitumoral en comparación con el epítopo silvestre (Martínez-Cortés et al., 2021). Adicionalmente, la vacunación con un epítopo de MuLV, que se aleatorizó individualmente en las posiciones 1, 3, 5 y 8, eliminó el tumor en la mayoría de los ratones (He et al., 2021). Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se han elegido otras posiciones, como es el caso de NoeDominguez-Romero y colaboradores que utilizaron las posiciones 3, 5 y 7 para aleatorizar y así generar una BEV a partir de un epítopo de 9 residuos derivado del TAA survivina sin afectar el efecto antitumoral de la BEV (NoeDominguez-Romero et al., 2014).

Por lo tanto, debido a que las substituciones que conforman las variantes del repertorio de 9MUC1spL se realizaron sin conocimientos experimentales previos es de esperar que no todas las variantes del repertorio de 9MUC1spL tengan el mismo efecto antitumoral. En consecuencia, se realizaron dos selecciones de variantes del epítopo de forma tal que estuvieron agrupadas con base en características comunes entre ellas. El criterio de selección elegido estuvo centrado en ensayos de proliferación de los linfocitos T CD8⁺ y se escogieron clonas que se comportaron como agonistas y antagonistas en la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ provenientes de ratones implantados con el tumor y vacunados con la biblioteca 9MUC1spL en comparación con los porcentajes de la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ de un grupo de ratones solo inmunizados (Figuras 5 y 6). Aunque este criterio nos permite evaluar cómo el ambiente tumoral modifica la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ se pueden elegir de igual manera diferentes criterios que pueden resultar interesantes a la hora de comprobar si las clonas derivadas del repertorio de una BEV tienen potencial en la inmunoterapia contra el cáncer.

Con base en el criterio utilizado se eligieron 8 clonas que se agruparon en dos selecciones, Negativa y Positiva, para demostrar cuál de estos grupos de clonas tienen un mayor valor en la inmunoterapia contra el cáncer. Las clonas agrupadas en la Selección Positiva se seleccionaron porque indujeron más la proliferación en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de un grupo de ratones con tumores y vacunados con 9MUC1spL en comparación con los provenientes de ratones sin tumores e inmunizados con 9MUC1spL.

En cambio, las clonas de la Selección Negativa se seleccionaron debido a que específicamente en presencia del tumor los linfocitos T CD8⁺ proliferaron menos cuando se cultivaron con estas clonas en comparación con los linfocitos T CD8⁺ provenientes de ratones inmunizados en ausencia del tumor (Figuras 5 y 6).

Cuando se analizó la proliferación en ausencia de la inmunización con la biblioteca 9MUC1spL, se determinó que los linfocitos T CD8⁺ proliferaron más en presencia de las clonas de la Selección Negativa en comparación de las clonas de la Selección Positiva (Figura 7). Esto indica que las clonas de la Selección Negativa son más antigénicas en ausencia de la inmunización, por lo tanto, la inmunización cambia el perfil antigénico de estas clonas. Estos resultados demuestran que los linfocitos T CD8⁺ activados por los antígenos tumorales, probablemente por la expresión endógena de MUC1 (en ausencia de la inmunización), proliferan en presencia de las clonas de la Selección Negativa (Figura 7).

Los resultados observados con las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva señalan dos posibles teorías. Por una parte, los linfocitos T CD8⁺ del grupo Terapia en los que su proliferación se vio disminuida en presencia de las clonas de la Selección Negativa están involucrados directamente en la eliminación de las células tumorales y son específicamente inhibidos para no ejercer su actividad efectora (Oliveira et al., 2021). En esta primera opción las clonas de la Selección Positiva al tener un comportamiento opuesto puede deducirse que no estén involucradas en la inducción de una respuesta celular antitumoral. En una segunda posibilidad se puede considerar que las clonas de la Selección Negativa, que no inducen eficientemente la proliferación en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo Terapia, no están involucrados en la respuesta antitumoral. Por ende, las clonas agrupadas en la Selección Positiva serían las que participan en la respuesta antitumoral debido a que inducen una mayor proliferación en estas células (Lam et al., 2021). En la inmunoterapia se busca emplear los epítomos inmunogénicos que son agonistas de los epítomos diana presentes en el tumor y que, por lo tanto, induzcan la proliferación en los linfocitos T (Slansky y Nakayama, 2020). En cambio, un epítomo inmunogénico que en un ambiente tumoral específicamente no induce la proliferación de los linfocitos T puede indicar que tienen suprimidas sus funciones efectoras debido a que reconocen los epítomos que se encuentran en el tumor (Oliveira et al., 2021). Estas dos posibilidades necesitan confirmarse con resultados experimentales.

La estrategia seguida en la construcción de la biblioteca 9MUC1spL no persiguió modificar la unión a las moléculas de clase I del MHC. Por este motivo, nos resultó interesante el hecho de que las clonas seleccionadas mostraron una tendencia a una peor predicción de unión a las moléculas de clase I del MHC, especialmente a la molécula H-2D, que es la molécula a la que mejor se predice que se une el epítipo silvestre (Figura 8). Las clonas agrupadas en las Selecciones Negativa y Positiva no mostraron diferencias significativas entre sí en la predicción de unión a las MHC-I. Estos resultados indican que las clonas indujeron diferencialmente la proliferación en los linfocitos T CD8⁺ por un mecanismo que no es por una modificación en la unión a las moléculas de clase I del MHC. Probablemente, se debió a un mecanismo que involucra a los linfocitos T, que fue la idea racional detrás de la construcción de 9MUC1spL (Figura 8). Aunque los valores de predicción de unión para las clonas seleccionadas caen en el rango de no unión, estos datos por lo general no necesariamente indican que no activen a los linfocitos T. Se ha demostrado que epítopos con un rango mayor, es decir, con una peor predicción de unión, han sido reconocidos por los linfocitos T y han inducido su activación (Bentzen et al., 2018; Martínez-Cortés et al., 2021).

8 Conclusión

Se agruparon exitosamente dos conjuntos de variantes del epítipo de Mucina 1 de ratón, Selecciones Positiva y Negativa, a partir de la biblioteca de epítipos variables 9MUC1spL, que inducen proliferaciones mayor y menor, respectivamente, en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de un grupo de ratones vacunados terapéuticamente con la biblioteca 9MUC1spL en comparación con los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo de ratones inmunizados con 9MUC1spL en ausencia del tumor.

9 Perspectivas

Las perspectivas futuras del trabajo presentado son:

- La evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de las Selecciones Positiva y Negativa en el modelo murino de cáncer de mama generado con la inoculación de las células 4T1. Se comprobará el efecto antitumoral luego de una inmunización al día 5 postimplante y con esquema de inmunización y refuerzos. Con esto se verificará cuál selección de clonas es más efectiva en la inmunoterapia contra el cáncer y si se puede obtener una mezcla de variantes con un repertorio reducido que tengan un efecto antitumoral superior al tratamiento con todo el repertorio de las BEV. Una vez que se tengan los resultados del efecto antitumoral *in vivo* se contará con un indicio del tipo de clonas que deben estar presentes en los repertorios de las BEV para favorecer el efecto antitumoral de estas.
- La evaluación del mecanismo de acción que guía a que los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo de ratones vacunados terapéuticamente con 9MUC1spL proliferen distintamente en presencia de las clonas de las Selecciones Negativa y Positiva.
 - La determinación del reconocimiento del epítipo silvestre por los linfocitos T activados por las Selecciones Negativa y Positiva. Con esto se verificará que las variantes del epítipo de MUC1, que contienen sustituciones que la hacen distintas al epítipo silvestre, pueden activar linfocitos T que reconocen de manera cruzada al epítipo silvestre, que es el blanco más probable en las células tumorales.
 - La determinación del papel que juegan las G-MDSC en la supresión de la proliferación y de la actividad efectora de los linfocitos T CD8⁺ que reconocen a las variantes del epítipo de las Selecciones Negativa y Positiva.

10 Referencias bibliográficas

- Alexandrou S., George S.M., Ormandy C.J. et al. (2019). The proliferative and apoptotic landscape of basal-like breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1-30.
- Almagro J.C., Daniels-Wells T.R., Perez-Tapia S.M. et al. (2018). Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy. *Front. Immunol.* **8**, 1-19.
- Alshetaiwi H., Pervolarakis N., McIntyre L. et al. (2020). Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics. *Sci. Immunol.* **5**, 1-19.
- Amrani A., Serra P., Yamanouchi J. et al. (2001). Expansion of the antigenic repertoire of a single T cell receptor upon T cell activation. *J. Immunol.* **167**, 655-666.
- Bagchi S., Yuan R. y Engleman E.G. (2021). Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **16**, 223-249.
- Bálint S., Müller S., Fisher R. et al. (2020). Supramolecular attack particles are autonomous killing entities released from cytotoxic T cells. *Science* **368**, 897-901.
- Bartlett J.M.S., Sgroi D.C., Treuner K. et al. (2019). Breast cancer index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the adjuvant tamoxifen-to offer more? (aTTom) trial. *Ann. Oncol.* **30**, 1776-1783.
- Baumann T., Dunkel A., Schmid C. et al. (2020). Regulatory myeloid cells paralyze T cells through cell-cell transfer of the metabolite methylglyoxal. *Nat. Immunol.* **21**, 555-566.
- Beckwith D.M. y Cudic M. (2020). Tumor-associated O-glycans of MUC1: carriers of the glycol-code and targets for cancer vaccine design. *Semin. Immunol.* **47**, 1-13.
- Bentzen A.K., Such L., Jensen K.K. et al. (2018). T cell receptor fingerprinting enables in-depth characterization of the interactions governing recognition of peptide-MHC complexes. *Nat. Biotechnol.* **36**, 1191-1196.
- Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A. et al. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev. Clin. Oncol.* **13**, 674-690.
- Borst J., Ahrends T., Bąbała N. et al. (2018). CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 635-647.

- Burke J.D. y Young H.A. (2019). IFN- γ : a cytokine at the right time, in in the right place. *Sem. Immunol.* **43**, 1-19.
- Burnet M. (1957). Cancer-a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* **1**, 779-786.
- Cañas-Ruano E., Martín-Castillo M., Raventós B. et al. (2020). Incidence of malignancy in a Spanish cohort of patients infected by the human immunodeficiency virus. *Med. Clin. (Barc.)* **155**, 288-294.
- Capietto A. Jhunjhunwala S., Pollock S.B. et al. (2020). Mutation position is an important determinant for predicting cancer neoantigens. *J. Exp. Med.* **217**, 1-18.
- Carmon L., Avivi I., Kovjazin R. et al. (2015). Phase I/II study exploring imMucin, a pan-major histocompatibility complex, anti-MUC1 signal peptide vaccine, in multiple myeloma patients. *Br. J. Haematol.* **169**, 44-56.
- Chao L., Tao L., Libin Y. et al. (2019). Prognostic and clinicopathological value of MUC1 expression in colorectal cancer. *Medicine* **9**, e14659.
- Chaudhry M.Z., Casalegno-Garduno R., Sitnik K.M. et al. (2020). Cytomegalovirus inhibition of extrinsic apoptosis determines fitness and resistance to cytotoxic CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 12961-12968.
- Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S. et al. (2009). The prioritization of cancer antigens: A National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5323-5337.
- Chen W., Zhang Z., Zhang S. et al. (2021). MUC1: structure, function, and clinical application in epithelial cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1-15.
- Chowell D., Krishna S., Becker P. et al. (2015). TCR contact residues hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8⁺ T cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **14**, E1754-E1762.
- Chruściel E., Urban-Wójciuk Z., Arcimowicz Ł. et al. (2020). Adoptive cell therapy-harnessing antigen-specific T cells to target solid tumours. *Cancers* **12**, 683-712.
- Dackus G.M.H.E., Jóźwiak K., Sonke G.S. et al. (2021). Adjuvant aromatase inhibitors or tamoxifen following chemotherapy for perimenopausal breast cancer patients. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **113**, 1506-1514.
- den Brok W.D., Speers C.H., Gondara L. et al. (2016). Survival with metastatic breast cancer based on initial presentation, de novo versus relapsed. *Breast Cancer Res. Treat.* **161**, 549-556.

- Deng X., Jiang P., Chen J. et al. (2020). GATA6 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through MUC1/ β -catenin pathway in cholangiocarcinoma. *Cell Death Dis.* **11**, 1-14.
- Dexter D.L., Kowalski H.M., Blazar B.A. et al. (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* **38**, 3174-3181.
- Dhar P. y McAuley J. (2019). The role of cell surface mucin MUC1 as a barrier to infection and regulator of inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1-8.
- Ding N., Liu C., Hu C. et al. (2019). Prognostic factors for luminal B-like breast cancer. *Curr. Med. Sci.* **39**, 396-402.
- Domínguez-Romero A.N., Martínez-Cortés F., Munguía M.E. et al. (2020). Generation of multiepitope cancer vaccines based on large combinatorial libraries of survivin-derived mutant epitopes. *Immunology* **161**, 123-138.
- Drăgănescu M. y Carmocan C. (2017). Hormone therapy in breast cancer. *Chirurgia* **112**, 413-417.
- Driscoll C.B., Schuelke M.R., Kottke T. et al. (2020). APOBEC3B-mediated corruption of the tumor cell immunopeptidome induces heteroclitic neoepitopes for cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **11**, 1-14.
- Dunn G.P., Old L.J. y Schreiber R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329-360.
- Eisenbarth S.C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 89-103.
- ElTanbouly M.A. y Noelle R.J. (2021). Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 257-267.
- Fares J., Fares M.Y., Khachfe H.H. et al. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 1-17.
- Feng B., Xing Y., Lan J. et al. (2020). Synthesis of MUC1 aptamer-stabilized gold nanoclusters for cell-specific imaging. *Talanta* **212**, 1-6.
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **149**, 778-789.
- Galluzzi L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.M. et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* **5**, 12472-12508.
- Galloway S.A.E., Dolton G., Attaf M. et al. (2019). Peptide super-agonist enhances T-cell responses to melanoma. *Front. Immunol.* **10**, 1-18.

- Gao J.J. y Swain S.M. (2018). Luminal A breast cancer and molecular assays: a review. *The Oncologist* **23**, 556-565.
- García-Nieto P.E., Morrison A.J. y Fraser H.B. (2019). The somatic mutation landscape of the human body. *Genome Biol.* **20**, 1-20.
- Garrido G., Schrand B., Levay A. et al. (2020). Vaccination against non-mutated neoantigens induced in recurrent and future tumors. *Cancer. Immunol. Res.* **8**, 856-868.
- Germano G., Lu S., Rospo G. et al. (2021). CD4 T cell-dependent rejection of beta-2 microglobulin null mismatch repair-deficient tumors. *Cancer Discov.* **11**, 1844-1859.
- Gibier J., Swierczewski T., Csanyi M. et al. (2021). MUC1 mitigates renal injury and inflammation in endotoxin-induced acute kidney injury by inhibiting the TLR4-MD2 axis and reducing pro-inflammatory macrophages infiltration. *SHOCK* **56**, 629-638.
- Gilfillan C.B., Hebeisen M., Rufer N. et al. (2021). Constant regulation for stable CD8 T-cell functional avidity and its possible implications for cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1348-1360.
- Greten F.R. y Grivennikov S.I. (2020). Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* **51**, 27-41.
- Grisdale M., Alghamdi S., Boutross-Tadross O. et al. (2021). Asymptomatic atypical hyperplasia and endometriosis following treatment with tamoxifen: a case report and review of the literature. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **43**, 85-87.
- Gris-Oliver A., Ibrahim Y.S., Rivas M.A. et al. (2021). PI3K activation promotes resistance to eribulin in HER2-negative breast cancer. *Brit. J. Cancer* **124**, 1581-1591.
- Gupta R.G., Li F., Roszik J. et al. (2021). Exploiting tumor neoantigens to target cancer evolution: current challenges and promising therapeutic approaches. *Cancer Discov.* **11**, 1024-1039.
- Hage F., Stroobant V., Vergnon I. et al. (2008). Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10119-10124.
- Hanahan D. y Weinberg R. (2001). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D. y Weinberg R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. (2019). Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **5**, 1-66.

- Hata T., Rajabi H., Yamamoto M. et al. (2019). Targeting MUC1-C inhibits TWIST1 signaling in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 1744-1754.
- Hayashi T., Takahashi T., Motoya S. et al. (2001). MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion* **63**, 87-92.
- He X., Zhou S., Quinn B. et al. (2021). Position-scanning peptide libraries as particle immunogens for improving CD8⁺ T-cell responses. *Adv. Sci. (Weinh)*, 1-14.
- Hervas-Stubbs S., Olivier A., Boisgerault F. et al. (2007). TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T-cell help. *Blood* **109**, 5318-5326.
- Holmström M.O., Cordua S., Skov V. et al. (2020). Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune scape in patients with hematological cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 315-324.
- Hu Z., Leet D.E., Allesøe R.L. et al. (2021). Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma. *Nat. Med.* **27**, 515-525.
- Jiang M., Gu D., Dai J. et al. (2020). Dark side of cytotoxic therapy: chemoradiation-induced cell death and tumor repopulation. *Trends Cancer* **6**, 419-431.
- Jiménez-Chávez Á.J., Nava-García B.K., Bustos-Jaimes I. et al. (2021). B19-VLPs as an effective delivery system for tumour antigens to induce humoral and cellular immune responses against triple negative breast cancer. *Immunol. Lett.* **239**, 77-87.
- Jones R.F., Reyes J.D., Gibson H.M. et al. (2019). An HER2 DNA vaccine with evolution-selected amino acid substitutions reveals a fundamental principle for cancer vaccine formulation in HER2 transgenic mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **68**, 1143-1155.
- Jørgensen C.L.T., Larsson A., Forsare C. et al. (2021). PAM50 intrinsic subtype profiles in primary and metastatic breast cancer show a significant shift toward more aggressive subtypes with prognostic implications. *Cancers* **13**, 1-18.
- Ju X., Zhang H., Zhou Z. et al. (2020). Tumor-associated macrophages induce PD-L1 expression in gastric cancer cells through IL-6 and TNF- α signaling. *Exp. Cell Res.* **396**, 1-9.
- Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D. et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411-422.
- Kapoor I., Bodo J., Hill B.T. et al. (2020). Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance. *Cell Death Dis.* **11**, 1-11.

- Keenan T.E. y Tolaney S.M. (2020). Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **18**, 479-489.
- Khan H., Makwana V., Nascimiento dos Santos S. et al. (2021). Development, characterization, and in vivo evaluation of a novel aptamer (anti-MUC1/Y) for breast cancer therapy. *Pharmaceutics* **13**, 1-17.
- Khemiri M., Doghri R., Mrad K. et al. (2019). Mucin-1 expression and localization in epithelial cells shows characteristic and distinct patterns in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **12**, 1731-1737.
- Khodabakhsh F., Merikhian P., Eisavand M.R. et al. (2021). Crosstalk between MUC1 and VEGF in angiogenesis and metastasis: a review highlighting roles of the MUC1 with an emphasis on metastatic and angiogenic signaling. *Cancer Cell Int.* **21**, 1-11.
- Kimachi K., Sugie K. y Grey H.M. (2003). Effector T cells have a lower ligand affinity threshold for activation than naive T cells. *Int. Immunol.* **15**, 885-892.
- Klein L., Robey E.A. y Hsieh C. (2019). Central CD4⁺ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 7-18.
- Knudsen E.S., Nambiar R., Rosario S.R. et al (2020). Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway. *Commun. Biol.* **3**, 1-12.
- Kontomanolis E.N, Koutras A., Syllaios A. et al. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer Res.* **40**, 6009-6015.
- Kottke T., Tonne J., Evgin L. et al. (2021). Oncolytic virotherapy induced CSDE1 neoantigenesis restricts VSV replication but can be targeted by immunotherapy. *Nat. Commun.* **12**, 1-15.
- Kovjazin R. y Carmon L. (2014). The use of signal peptide domains as vaccine candidates. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2733-2740.
- Kovjazin R., Volovitz I., Kundel Y. et al. (2011). ImMucin: a novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors. *Vaccine* **29**, 4676-4686.
- Kubick B.J., Fan X., Crouch A. et al. (2020). Tracing the equilibrium phase of cancer immunoediting in epidermal neoplasms via longitudinal, intravital imaging. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 891-900.
- Kufe D.W. (2013). MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 1073-1081.

- Lam H., McNeil L.K., Starobinets H. et al. (2021). An empirical antigen selection method identifies neoantigens that either elicit broad antitumor T-cell responses or drive tumor growth. *Cancer Discov.* **11**, 696-713.
- Lazoura E., Lodding J., Farrugia W. et al. (2006). Enhanced major histocompatibility complex class I binding and immune responses through anchor modification of the non-canonical tumor-associated mucin 1-8 peptide. *Immunology* **119**, 306-316.
- Lee J.S., Yost S.E. y Yuan Y. (2020). Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: recent progresses and challenges. *Cancers* **12**, 1-20.
- Lee S.E., Lee H.S., Kim K. et al. (2019). High prevalence of the MLH1 V384D germline mutation in patients with HER2-positive luminal B breast cancer. *Sci. Rep.* **9**, 1-10.
- Levine A.J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 471-480.
- Levitin F., Stern O., Weiss M. et al. (2005). The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 33374-33386.
- Li C., Liu T., Yin L. et al. (2019). Prognostic and clinicopathological value of MUC1 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **98**, 1-8.
- Li C.I., Zhang Y., Cieslik M. et al. (2021b). Cancer cell intrinsic and immunologic phenotypes determine clinical outcomes in basal-like breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **27**, 3079-3093.
- Li F., Deng L., Jackson K.R. et al. (2021a). Neoantigen vaccination induces clinical and immunologic responses in non-small cell lung cancer patients harboring EGFR mutations. *J. Immunother. Cancer* **9**, 1-19.
- Lim Y.W., Coles G.L., Sandhu S.K. et al. (2021). Single-cell transcriptomics reveals the effect of PD-L1/TGF- β blockade on the tumor microenvironment. *BMC Biol.* **19**, 1-17.
- Linette G.P., Becker-Hapak M., Skidmore Z.L. et al. (2019). Immunological ignorance is an enabling feature of the oligo-clonal T cell response to melanoma neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 23662-23670.
- Linette G.P., Stadtmauer E.A., Maus M.V. et al. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* **122**, 863-871.

- Liu L., Wang Y., Miao L. et al. (2018). Combination immunotherapy of MUC1 mRNA nano-vaccines and CTLA-4 blockade effectively inhibits growth of triple negative breast cancer. *Mol. Ther.* **26**, 45-55.
- Loibl S. y Gianni L. (2017). HER2-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2415-2429.
- Lorgulescu J.B., Braun D., Oliveira G. et al. (2018). Acquired mechanisms of immune escape in cancer following immunotherapy. *Genome. Med.* **10**, 1-4.
- Ma Q., Song J., Wang S. et al. (2021). MUC1 regulates AKT signaling pathway by upregulating EGFR expression in ovarian cancer cells. *Pathol. Res. Pract.* **224**, 1-7.
- MacKie R.M. y Reid R. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Eng. J. Med.* **348**, 567-568.
- Madura F., Rizkallah P.J., Holland C.J. et al. (2015). Structural basis for ineffective T-cell responses to MHC anchor residue-improved heteroclitic peptides. *Eur. J. Immunol.* **45**, 584-591.
- Manoutcharian K. y Guzman J. (2019). Neoantigen cancer vaccines: real opportunity or another illusion? *Cancer Arch.* **1**, 1-2.
- Marra A., Trapani D., Viale G. et al. (2020). Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *NPJ Breast Cancer* **6**, 1-16.
- Marijt K.A., Griffioen L., Blijleven L. et al. (2021). Cross-presentation of a TAP-independent signal peptide induces CD8 T immunity to escaped cancers but necessitates anchor replacement. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1-12.
- Marijt K.A. y van Hall T. (2020). To TAP or not to TAP: alternative peptides for immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **64**, 15-19.
- Martínez-Cortés F., Servín-Blanco R., Domínguez-Romero A.N. et al. (2021). Generation of cancer vaccine immunogens derived from Oncofetal antigen (OFA/iLRP) using variable epitope libraries tested in an aggressive breast cancer model. *Mol. Immunol.* **139**, 65-75.
- Masuda T., Ueo H., Kai Y. et al. (2020). N-cadherin mRNA levels in peripheral blood could be a potential indicator of new metastases in breast cancer: a pilot study. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-17.
- Maurus K., Appenzeller S., Roth S. et al. (2018). Panel sequencing shows recurrent genetic Fas alterations in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1573-1581.

- McKay R.R., Hafron J.M., Ferro C. et al. (2020). A retrospective observational analysis of overall survival with sipuleucel-T in medicare beneficiaries treated for advanced prostate cancer. *Adv. Ther.* **37**, 4910-4929.
- Michels N., van Aart C., Morisse J. et al. (2021). Chronic inflammation towards cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **157**, 1-36.
- Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D. et al. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases - elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16-25.
- Moase E.H., Qi W., Ishida T. et al. (2001). Anti-MUC-1 immunoliposomal doxorubicin in the treatment of murine models of metastatic breast cancer. *Bioch. Biophys. Acta* **1510**, 43-55.
- Modi S., Saura C., Yamashita T. et al. (2020). Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *N. Eng. J. Med.* **382**, 610-621.
- Møller S.H., Møllergaard M., Madsen M. et al. (2020). Cytoplasmic citrate flux modulates the immune stimulatory NKG2D ligand MICA in cancer cells. *Front. Immunol.* **11**, 1-22.
- Morisaki T., Kubo M., Umebayashi M. et al. (2021). Neoantigens elicit T cell responses in breast cancer. *Sci. Rep.* **11**, 1-11.
- Nath S. y Mukherjee P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* **20**, 332-342.
- Netherby C.S., Messmer M.N., Burkard-Mandel L. et al. (2017). The granulocyte progenitor stage is a key target of IRF8-mediated regulation of myeloid-derived suppressor cell production. *J. Immunol.* **198**, 4129-4139.
- Neuse C.J., Lomas O.C., Schliemann C. et al. (2020). Genome instability in multiple myeloma. *Leukemia* **34**, 2887-2897.
- NoeDominguez-Romero A., Zamora-Alvarado R., Servín-Blanco R. et al. (2014). Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 3201-3213.
- Noureen N., Wu S., Lv Y. et al. (2021). Integrated analysis of telomerase enzymatic activity unravels an association with cancer stemness and proliferation. *Nat. Commun.* **12**, 1-11.

- O'Donnell J.S, Teng M.W. y Smyth M. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 151-167.
- Oh D. y Bang Y. (2020). HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 33-48.
- Oliveira G., Stromhaug K., Klaeger S. et al. (2021). Phenotype, specificity and avidity of antitumoral CD8⁺ T cells in melanoma. *Nature* **596**, 119-125.
- Ott P.A, Hu-Lieskovan S., Chmielowski B. et al. (2020). A Phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer. *Cell* **183**, 347-362.
- Ouzounova M., Lee E., Piranlioglu R. et al. (2017). Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat. Commun.* **8**, 1-13.
- Pasha N. y Turner N.C. (2021). Understanding and overcoming tumor heterogeneity in metastatic breast cancer treatment. *Nat. Cancer* **2**, 680-692.
- Pedroza-Roldan C., Charles-Niño C., Saavedra R. et al. (2009). Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Mol. Immunol.* **47**, 270-282.
- Peng S., Ferrall L., Gaillard S. et al. (2021). Development of DNA vaccine targeting E6 and E7 proteins of Human Papillomavirus 16 (HPV16) and HPV18 for immunotherapy in combination with recombinant vaccinia boost and PD-1 antibody. *mBio* **12**, 1-19.
- Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B. et al. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1659-1672.
- Piranlioglu R., Lee E., Ouzounova M. et al. (2019). Primary tumor-induced immunity eradicates disseminated tumor cells in syngeneic mouse model. *Nat. Commun.* **10**, 1-13.
- Piyush T., Chacko A.R., Sindrewicz P. et al. (2017). Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. *Cell Death Differ.* **24**, 1937-1947.
- Poudel P., Nyamundanda G., Patil Y. et al. (2019). Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. *NPJ Breast Cancer* **5**, 1-10.
- Pulaski B.A. y Ostrand-Rosenberg S. (2000). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* 20.2.1-20.2.16.

- Quezada S.A., Simpson T.R., Peggs K.S. et al. (2010). Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637-650.
- Reynisson B., Alvarez B., Paul S. et al. (2020). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res.* **48**, W449-W454.
- Riva L., Pandiri A.R., Li Y.R. et al. (2020). The mutational signature profile of known and suspected human carcinogens in mice. *Nat. Genet.* **52**, 1189-1197.
- Robert C. (2020). A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat. Commun.* **11**, 1-3.
- Romero-Cordoba S.L., Salido-Guadarrama I., Rebollar-Vega R. et al. (2021). Comprehensive omic characterization of breast cancer in Mexican-Hispanic women. *Nat. Commun.* **12**, 1-19.
- Rossin A., Miloro G. y Hueber A. (2019). TRAIL and FasL functions in cancer and autoimmune diseases: towards an increasing complexity. *Cancers* **11**, 1-18.
- Sahin U., Oehm P., Derhovanessian E. et al. (2020). An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* **585**, 107-112.
- Sahraei M., Bose M., Sanders J.A. et al. (2021). Repression of MUC1 promotes expansion and suppressive function of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic and breast cancer murine models. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1-15.
- Samur M.K., Fulciniti M., Samur A.A. et al. (2021). Biallelic loss of BCMA as a resistance mechanism to CAR T cell therapy in a patient with multiple myeloma. *Nat. Commun.* **12**, 1-7.
- Schmid P., Cortes J., Pusztai L. et al. (2020). Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N. Eng. J. Med* **382**, 810-821.
- Schmidt J., Smith A.R., Magnin M. et al. (2021). Prediction of neo-epitope immunogenicity reveals TCR recognition determinants and provides insight into immunoediting. *Cell Rep. Med.* **2**, 1-14.
- Schrörs B., Boegel S., Albrecht C. et al. (2020). Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front. Oncolog.* **10**, 1-14.
- Servín-Blanco R., Chávaro-Ortiz R.M., Zamora-Alvarado R. et al. (2018). Generation of cancer vaccine immunogens derived from major histocompatibility complex (MHC) class I molecules using variable epitope libraries. *Immunol. Lett.* **204**, 47-54.

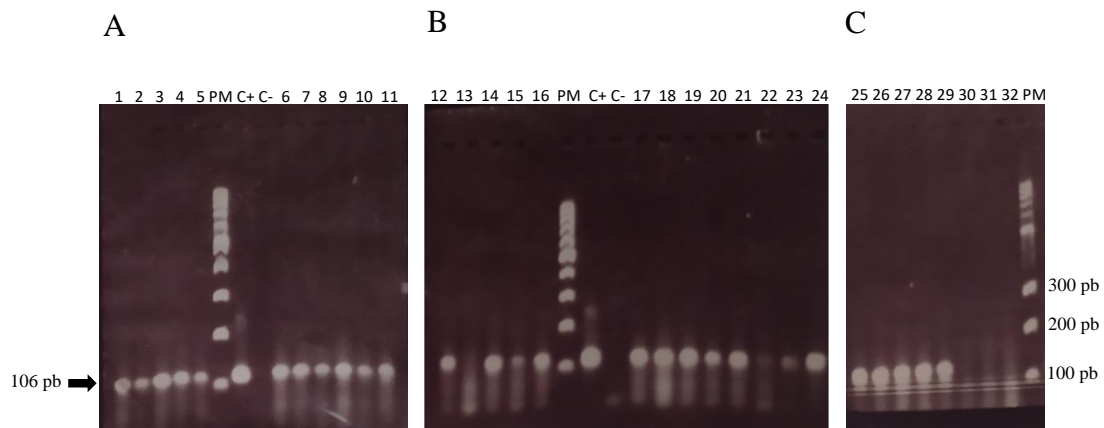
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. et al. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111.
- Shaopeng Z., Xiaojie G., Jiannan Q. et al. (2021). IL-10 derived from Hepatocarcinoma cells improves human induced regulatory T cells function via JAK1/STAT5 pathway in tumor microenvironment. *Mol. Immunol.* **133**, 163-172.
- Sheng I.Y., Diaz-Montero C.M., Rayman P. et al. (2020). Blood myeloid-derived suppressor cells correlate with neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in metastatic urothelial carcinoma. *Target. Oncol.* **15**, 211-220.
- Singh R., Das S., Datta S. et al. (2020). Study of caspase 8 mutation in oral cancer and adjacent precancer tissues and implication in progression. *Plos One* **15**, 1-10.
- Sirviö E., Mikkonen J.J.W., Koistinen A.P. et al. (2019). Localization of transmembrane mucin MUC1 on the apical surface of oral mucosal cells. *Ultrastruct. Pathol.* **43**, 184-189.
- Slansky J.E. y Nakayama M. (2020). Peptide mimotopes alter T cell function in cancer and autoimmunity. *Sem. Immunol.* **47**, 1-10.
- Smith A.R., Alonso J.A., Ayres C.M. et al. (2021). Structurally silent peptide anchor modifications allosterically modulate T cell recognition in a receptor-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, 1-10.
- Soerjomataram I. y Bray F. (2021). Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 663-672.
- Stanojevic M., Hont A.B., Geiger A. et al. (2021). Identification of novel HLA-restricted preferentially expressed antigen in melanoma peptides to facilitate off-the-shelf tumor-associated antigen-specific T-cell therapies. *Cytotherapy* **23**, 694-703.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**, 209-249.
- Supruniuk K. y Radziejewska I. (2021). MUC1 is an oncoprotein with a significant role in apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.* **59**, 1-11.
- Swain S.M., Miles D., Kim S. et al. (2020). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **21**, 519-530.
- Syrkina M.S. y Rubtsov M.A. (2019). MUC1 in cancer immunotherapy-new hope or phantom menace? *Biochemistry (Moscow)* **84**, 773-781.

- Tan S., Li D. y Zhu X. (2021). Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond. *Biomed. Pharmacother.* **124**, 1-11.
- Thompson E., Shanmugam K., Hatstrup C. et al. (2006). Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor- κ B pathways. *Mol. Cancer Res.* **4**, 489-497.
- Tomita Y., Kondo T., Kimura G. et al. (2020). Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in previously untreated advanced renal-cell carcinoma: analysis of Japanese patients in CheckMate 214 with extended follow-up. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **50**, 12-19.
- Tundidor Y., Ponce L.F., Chao L. et al. (2020). Affinity-matured variants derived from nimotuzumab keep the original fine specificity and exhibit superior biological activity. *Sci. Rep.* **10**, 1-14.
- Verma A., Mathur R., Farooque A. et al. (2019). T-regulatory cells in tumor progression and therapy. *Cancer Manag. Res.* **11**, 10731-10747.
- von Essen M.R., Kongsbak M. y Geisler C. (2012). Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1-8.
- Wang M., Munoz J., Goy A. et al. (2020). KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Eng. J. Med.* **382**, 1331-1342.
- Whitehouse C. y Burchell J. (1997). A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J. Cell Biol.* **137**, 1229-1241.
- Williams L.A., Butler E.N., Sun X. et al. (2018). TP53 protein levels, RNA-based pathway assessment, and race among invasive breast cancer cases. *NPJ Breast Cancer* **4**, 1-6.
- Wisdom A.J., Mowery Y.M., Hong C.S. et al. (2020). Single cell analysis reveals distinct immune landscapes in transplant and primary sarcomas that determine response or resistance to immunotherapy. *Nat. Commun.* **11**, 1-14.
- Wooldridge L., Ekeruche-Makinde J., Van Den Berg H.A. et al. (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* **287**, 1168-1177.
- Wu Y., Kyle-Cezar F., Woolf R.T. et al. (2019). An innate-like V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1-13.

- Wu Z., Yan L., Lin J. et al. (2021). Constitutive TDO2 expression promotes liver cancer progression by an autocrine IL-6 signaling pathway. *Cancer Cell Inter.* **21**, 1-9.
- Yadav P.K., Gupta S.K., Kumar S. et al. (2021). MMP-7 derived peptides with MHC class-I binding motifs from canine mammary tumor tissue elicit strong antigen-specific T-cell responses in BALB/c mice. *Mol. Cell. Biochem.* **476**, 311-320.
- Yang Y., Li C., Liu T. et al. (2020). Myeloid-derived suppressor cells in tumors: from mechanisms to antigen specificity and microenvironmental regulation. *Front. Immunol.* **11**, 1-22.
- Yasumizu Y., Rajabi H., Jin C. et al. (2020). MUC1-C regulates lineage plasticity driving progression to neuroendocrine prostate cancer. *Nat. Commun.* **11**, 1-13.
- Yizhak K., Aguet F., Kim J. et al. (2019). RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. *Science* **364**, 1-9.
- Zhang L., Vlad A., Milcarek C. et al. (2013). Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 423-435.
- Zhao H. (2021). The prognosis of invasive ductal carcinoma, lobular carcinoma and mixed ductal and lobular carcinoma according to molecular subtypes of the breast. *Breast Cancer* **28**, 187-195.
- Zhao X., Wang Y., He J. et al. (2020). LncRNA UCA1 maintains the low-tumorigenic and nonmetastatic status by stabilizing E-cadherin in primary prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* **59**, 1174-1187.

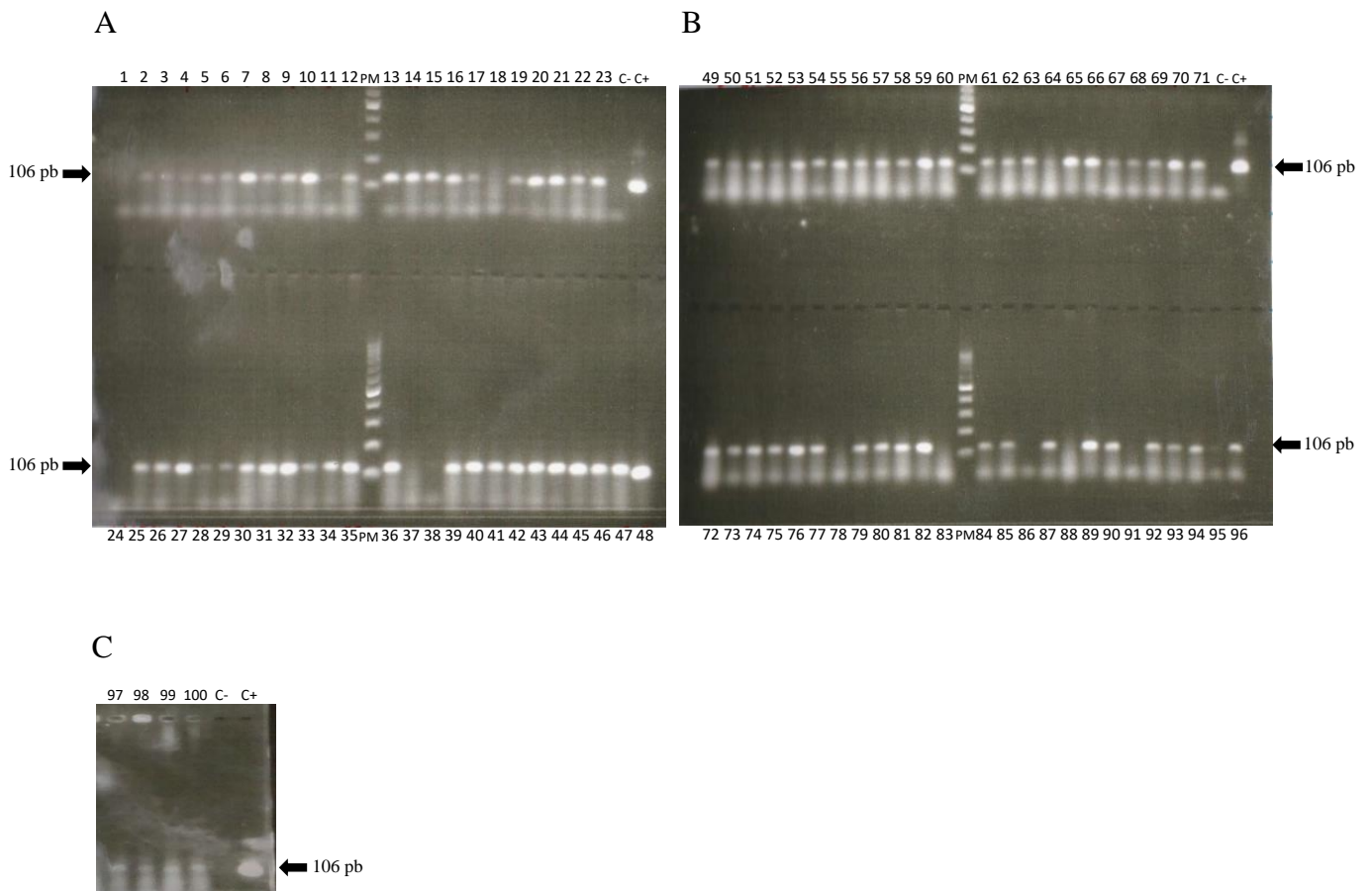
11 Apéndices

11.1 Apéndice 1



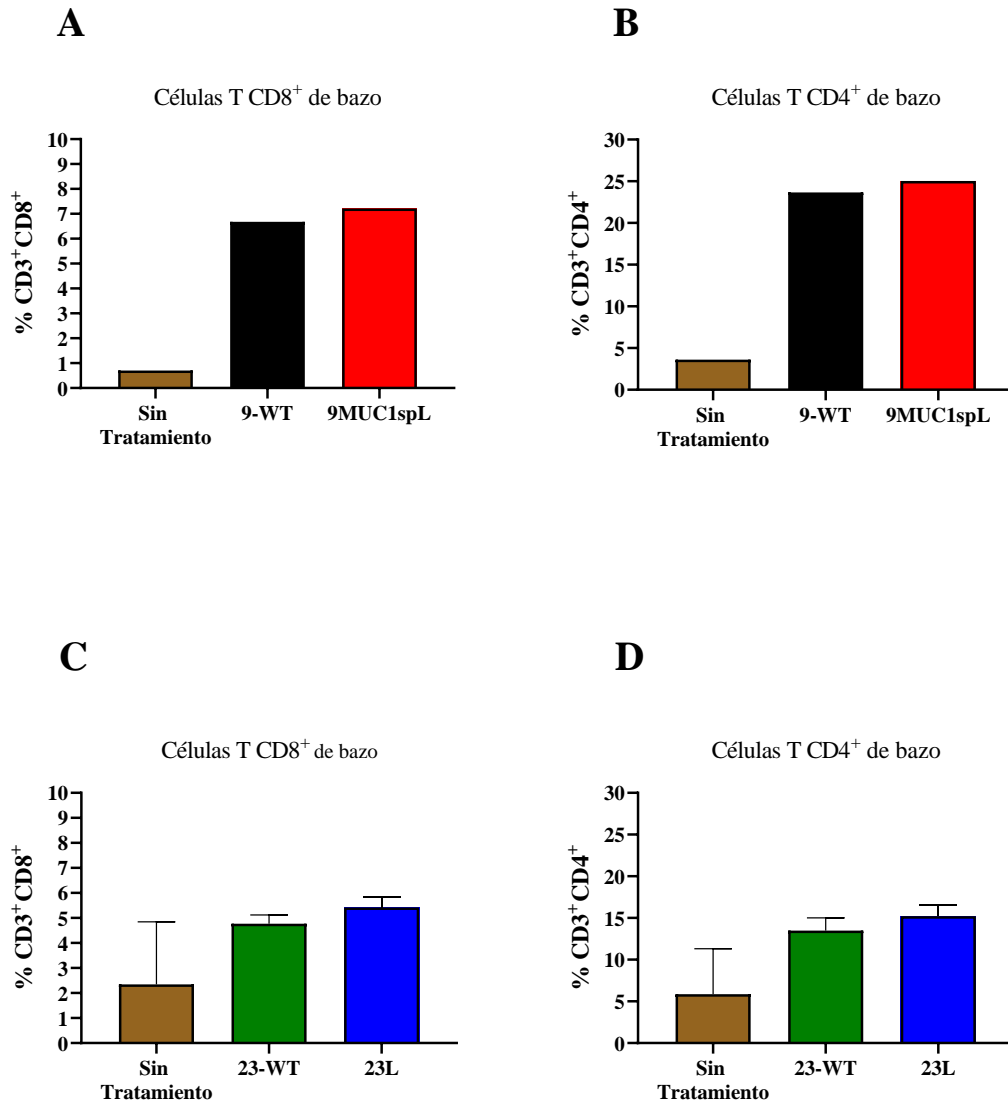
Determinación de la eficiencia de la clonación de la biblioteca de epítomos variables 9MUC1spL (PGXRXPFXL) mediante la identificación de la presencia del inserto de ADN (106 pb) en pG8SAET. A-C, se realizaron PCR a 32 colonias de *E. coli* previamente electroporadas con 9MUC1spL mediante el uso de los oligonucleótidos 5'DAMP y 3'DAMP. Cada carril corresponde al producto de la reacción de PCR de una clona de la biblioteca 9MUC1spL. Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2 %. PM, patrón de peso molecular; C-, control negativo de la PCR y C+, control positivo de la PCR.

11.2 Apéndice 2



Comprobación de la presencia del inserto de ADN en el vector pG8SAET. Variantes del epítipo de la biblioteca 9MUC1spL empleadas en la confección del panel de 84 clonas de las que se obtuvieron las Selecciones Positiva y Negativa. A-C, Producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 5'DAMP y 3'DAMP de 100 colonias de *E. coli* previamente transformadas con 9MUC1spL. Cada carril corresponde al producto de la reacción de PCR de una clona de la biblioteca 9MUC1spL. PM, patrón de peso molecular; C-, control negativo de la PCR y C+, control positivo de la PCR. Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2 %.

11.3 Apéndice 3



Cuantificación de las células T CD8⁺ y CD4⁺ de bazo luego del tratamiento con las bibliotecas 9MUC1spL y 23L. Ratones hembra BALB/c se implantaron con 10⁴ células 4T1 y se inmunizaron 5 días posteriores con 180 µg del adyuvante poli I:C y 180 µg del péptido sintético correspondiente. 2,5 x 10⁵ células provenientes de los bazos de tres ratones por grupo al día 30 postimplante de la línea celular se incubaron con los anticuerpos antiCD3-APCeFluor780, antiCD8-PE y antiCD4-APC. Los datos se muestran como el porcentaje de las células CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺ con respecto a las células individuales totales adquiridas en el citómetro. Los datos corresponden a un solo experimento.