



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8+ específicos inducidos por los mimótopos presentes en los CDRs de anticuerpos policlonales anti-idiotipo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
CYNTHIA DANIELA IBARRA MORENO

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. ROMINA MARÍA DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. JOSÉ ALBERTO CANO BUENDÍA  
[Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos Institucionales**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por permitirme continuar con mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría (CVU 1045246)

A los apoyos de financiamiento para la realización de este proyecto:

- PAPIIT (IN205216)
- CONACyT (N283036)

## **Agradecimientos**

Al Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, por permitirme realizar mi proyecto de maestría en su laboratorio, por su apoyo y asesoría a lo largo de todo el proyecto.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja y al Dr. José Alberto Cano Buendía, por enriquecer el proyecto con sus aportaciones y sugerencias en cada evaluación tutorial.

A los miembros del jurado por las observaciones realizadas en la revisión del trabajo escrito: Dr. Andrés Castell Rodríguez, Dra. Martha Robles Flores, Dr. Pedro Ostoa Saloma, Dra. Elizabeth Langley McCarron, y Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay.

A Nathaly Vásquez Martínez, estudiante de doctorado de la Dra. Romina Rodríguez Sanoja, por su apoyo técnico y orientación en las purificaciones de anticuerpos.

A mis compañeros del laboratorio Josué, Fernando y Allan por sus sugerencias, orientación y apoyo en la realización de los experimentos con la línea celular y el modelo animal.

## ÍNDICE

Resumen .....	4
1 Introducción.....	5
1.1 Generalidades del cáncer .....	5
1.2 Cáncer de mama.....	6
1.2.1 Clasificación.....	7
1.2.2 Tratamiento.....	8
1.3 Respuesta inmune contra el cáncer.....	9
1.4 Inmunoterapia en cáncer .....	10
1.5 Anticuerpos anti-idiotipo.....	11
1.5.1 Inmunoterapia basada en los idiotipos .....	12
1.5.1.1 Tratamientos con anticuerpos anti-idiotipo en cáncer de mama .....	14
2 Antecedentes .....	17
3 Hipótesis.....	20
4 Objetivos .....	21
4.1 Objetivo General .....	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
5 Materiales y Métodos .....	22
5.1 Implante de la línea tumoral 4T1 en ratones BALB/c.....	22
5.2 Purificación de anticuerpos específicos contra el tumor 4T1 (Ab1) por cromatografía de afinidad con proteína G .....	22
5.3 Generación y purificación de anticuerpos anti-idiotipo contra el Ab1 (Ab2).....	23
5.4 Evaluación de la integridad, pureza y especificidad de los anticuerpos .....	23
5.5 Evaluación de la respuesta inmune inducida por los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) .....	23
5.6 Obtención de células de bazo y de tumor.....	24
5.7 Inmunofenotipificación de células de bazo .....	24
5.8 Análisis estadístico.....	25
6 Resultados .....	26
6.1 Purificación de anticuerpos IgG totales (Ab1) de suero por cromatografía de afinidad con proteína G .....	26
6.2 Purificación de los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) mediante cromatografía de afinidad con proteína G. ....	30
6.3 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo.....	33
6.4 Inmunofenotipificación de células infiltrantes de bazo y tumor .....	34
7 Discusión.....	37
8 Conclusión.....	43
9 Perspectivas.....	44
10 Referencias .....	45

## Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y de mayor mortalidad en mujeres a nivel mundial. Entre los tratamientos actuales se encuentra la inmunoterapia, dentro de la cual se incluyen terapias con anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos fueron descritos por primera vez por Niels Jerne en su teoría de la red de idiotipo en 1974. Los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) están dirigidos contra la región determinante de la complementariedad (CDR) de un primer anticuerpo que reconoce un antígeno específico (Ab1). Debido a que tanto el antígeno como el idiotipo del Ab2 se unen al sitio de unión al antígeno del Ab1, el sitio de unión del Ab2 será estructuralmente similar al antígeno y por lo tanto se ha planteado la idea de que el Ab2 mimetiza al antígeno nominal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo policlonales es capaz de generar respuestas de linfocitos en un modelo murino de cáncer de mama. Para lo cual, se purificaron IgG policlonales totales (Ab1) de suero de ratones con tumor de la línea 4T1 mediante cromatografía de afinidad con proteína G. Posteriormente, ratones sanos se inmunizaron vía intraperitoneal con los anticuerpos purificados (Ab1) para generar el anticuerpo anti-idiotipo (Ab2). Los Ab2 se purificaron de suero por cromatografía de afinidad con proteína G y se administraron como tratamiento a ratones BALB/c hembra con tumor 4T1 al día 5 posterior al implante y también se incluyó un grupo administrado con Ab1. Los ratones fueron sacrificados al día 30, se obtuvieron células de bazo y tumor para realizar inmunofenotipificación y se realizó el conteo de metástasis en pulmones.

En los grupos tratados con Ab1 y Ab2 se observó mayor crecimiento tumoral en comparación con los grupos control y no se observó reducción en el número de metástasis con ninguno de los tratamientos. En bazo, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se incrementó en el grupo tratado con Ab2, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y de células supresoras derivadas mieloides granulocíticas (G-MDSC) se mantuvo muy similar en todos los grupos. Por otro lado, en tumor no se observó incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se observó una disminución en la proporción de G-MDSC, pero este cambio no fue estadísticamente significativo.

Se concluye que el tratamiento de una dosis vía subcutánea de anticuerpos anti-idiotipo policlonales no tiene efecto antitumoral en este modelo murino de cáncer de mama.

# **1 Introducción**

## **1.1 Generalidades del cáncer**

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades que involucran la división anormal y descontrolada de células transformadas a células malignas, por mutaciones en genes involucrados en proliferación y supervivencia celular, con la capacidad de esparcirse a otros órganos (NCI, 2015; González, et al., 2018). Las mutaciones que provocan la transformación pueden tener su origen en agentes externos o en factores genéticos heredados (Civetta & Civetta, 2011).

Con el fin de facilitar la comprensión de la biología del cáncer Hanahan y Weinberg describieron una serie de características que las células cancerosas adquieren en el desarrollo de la enfermedad permitiéndoles proliferar, sobrevivir y diseminarse (Hanahan & Weinberg, 2011). Un aspecto fundamental en el desarrollo del cáncer es la capacidad de mantener la proliferación activa mediante la pérdida de regulación en el control de las señales proliferativas, la activación de oncogenes y la supresión de genes supresores tumorales (Fouad & Aenei, 2017). Las células de cáncer pueden secretar los factores de crecimiento y estimularse a sí mismas, además pueden incrementar la expresión de los receptores para estos factores mediante mutaciones somáticas que provocan activación constitutiva, amplificación genética y desregulación entre el reciclaje y la maquinaria de degradación de receptores (Hanahan & Weinberg, 2011). Son muy comunes también las afectaciones en las vías de señalización involucradas en proliferación, por ejemplo, las mutaciones en los genes involucrados en la cascada de señalización de la oncoproteína RAS la mantienen activada en 30% de los cánceres. Asimismo, las células también presentan la capacidad de evadir supresores de crecimiento mediante la inactivación de los genes supresores de tumores, como los que codifican a las proteínas RB (asociada a retinoblastoma) y p53, importantes supresores de la proliferación (Sánchez, et al., 2018).

Otro mecanismo que debe habilitarse en el desarrollo del cáncer para asegurar la supervivencia es la evasión a la muerte celular. En condiciones de homeostasis la apoptosis se activa ante estímulos externos e internos de estrés para la célula como un mecanismo de respuesta ante eventos irreparables o que puedan comprometer al tejido, como el daño al DNA o proliferación descontrolada, a través de mecanismos que funcionan como sensores de estrés (Jan, et al., 2019; Fouad & Aenei, 2017). Sin embargo, en la tumorigénesis se desarrollan varios mecanismos que les permiten a las células evitar la apoptosis y les confieren resistencia a la muerte celular. Principalmente se presenta la

pérdida de la función de supresión tumoral de p53, que es uno de los principales sensores de daño y estrés celular, pero también existe aumento en proteínas anti-apoptóticas, disminución en proteínas pro-apoptóticas e inhibición de la función de las caspasas (Jan, et al., 2019; Fernald & Kurokawa, 2013). Adicionalmente, la inmortalidad replicativa es necesaria para formar un tumor macroscópico. Esta capacidad se obtiene principalmente de la sobreexpresión de la telomerasa, la cual es una enzima que permite alargar los telómeros y por lo tanto permite replicarse de manera ilimitada y la protege de entrar en un estado de senescencia (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por otro lado, los tumores requieren de un mayor abastecimiento de oxígeno y nutrientes debido a su alta tasa proliferativa, por lo que la angiogénesis es un proceso esencial que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, uno de los mecanismos que inducen este proceso en los tumores es la hipoxia y la sobreexpresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Saman, et al., 2020). Debido a que el requerimiento de energía es mayor, el metabolismo de las células de cáncer también se ve modificado. Un fenómeno comúnmente observado en las células tumorales es el efecto Warburg o glucólisis aerobia, en el cuál la célula dirige al piruvato obtenido de la oxidación de la glucosa hacia la producción de lactato, aún en presencia de oxígeno suficiente, y disminuyendo la fosforilación oxidativa para hacer más eficiente la síntesis de ATP (Liberti & Locasale, 2016).

Finalmente, la capacidad de migrar e invadir otros tejidos se adquiere principalmente de alteraciones en los mecanismos de anclaje y unión entre células y con la matriz extracelular. Una de las moléculas de adhesión celular de la que comúnmente se disminuye su expresión es la E cadherina, la cuál es crucial en la unión entre células y permite la formación de epitelios (Guan, 2015; Mäkitie, et al., 2019). Así mismo, moléculas de adhesión asociadas con la migración como la N-cadherina se ven sobreexpresadas en carcinomas invasivos. El proceso de metástasis comprende varias etapas que incluye el ingreso de células tumorales a vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, transporte de dichas células a través de sangre y linfa, extravasación de las células al parénquima de otro tejido, formación de micrometástasis y por último crecimiento a un tumor macroscópico (Guan, 2015).

## **1.2 Cáncer de mama**

El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido originando más de 100 tipos. Entre los más comunes se encuentra el cáncer de mama (NCI, 2015), el cual es el tipo más

diagnosticado entre las mujeres a nivel mundial, afectando a más de 1.5 millones de mujeres cada año y siendo una de las principales causas de muerte (Bray, et al., 2018).

En cuanto a la incidencia, este tipo de cáncer se diagnostica en etapas tempranas principalmente en países desarrollados y por lo tanto en estos países el pronóstico es más favorable, mientras que en países en vías de desarrollo el acceso a mamografías y otros métodos de diagnóstico es más limitado y por lo tanto el diagnóstico se hace en etapas más tardías lo que limita la eficacia de los tratamientos (Harbeck, et al., 2019).

Las mutaciones que originan el cáncer de mama están principalmente en genes involucrados en modular el ciclo celular que se reprimen o se activan para evitar la apoptosis o mantener la proliferación celular e inhibir rutas de oncogenes. Comúnmente el cáncer de mama se genera a partir de múltiples mutaciones de baja penetrancia que actúan de forma acumulativa (Lukasiewicz, et al., 2021). Este tipo de cáncer puede ser de tipo invasivo o no invasivo y ambos pueden desarrollarse en las células epiteliales de los ductos o de los lóbulos mamarios; en ambos casos el tipo ductal es el más común con una incidencia de más del 80% (Watkins, et al., 2019).

Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de mama se pueden dividir entre modificables y no modificables. Entre los primeros se encuentran la obesidad, la inactividad física, el consumo de alcohol, el uso de cigarro, estar bajo tratamientos de reemplazo hormonal, entre otros. Mientras que en los no modificables se encuentra la edad, tener antecedentes familiares de la enfermedad, raza o etnia, embarazo, menopausia, etc. (Lukasiewicz, et al., 2021).

### **1.2.1 Clasificación**

El cáncer de mama se puede clasificar en varios subtipos de acuerdo con la presencia o ausencia en la expresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona. La primera clasificación de tipo molecular la realizó Perou y col. en el 2000, denominada clasificación intrínseca, a partir del análisis de patrones de expresión de genes (Eliyatkin, et al., 2015; Perou, et al., 2000).

El primer subtipo es el Luminal, el cual expresa el receptor de estrógenos (ER), comprende el 70% de los cánceres de mama invasivos y a su vez se divide en luminal A y B. El subtipo luminal A se caracteriza por la expresión del ER y/o del receptor de progesterona (PR), ausencia de expresión de HER2 y baja expresión de genes relacionados con proliferación.

Por otro lado, el luminal B expresa ER, puede ser PR negativo y/o HER2 positivo y tiene alta expresión de genes asociados a proliferación, por lo tanto, este subtipo tiende a un peor pronóstico que el anterior (Lukasiewicz, et al., 2021).

El siguiente subtipo dentro de esta clasificación es el HER2 enriquecido, el cual representa entre el 10 y 15% de los cánceres de mama y se caracteriza por tener una alta expresión de HER2 y ausencia de ER y PR. Estos últimos subtipos pueden ser tratados con terapia dirigida como la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales dirigidos contra alguno de los receptores ya mencionados (Hon, et al., 2016).

En el tercer subtipo, denominado triple negativo o de tipo basal, no hay expresión de ninguno de los receptores mencionados anteriormente, representa el 20% de todos los cánceres de mama y es el subtipo más agresivo y con peor pronóstico en las pacientes (Watkins, 2019; Hon, et al., 2016). El último subtipo en describirse es el cáncer de mama con baja expresión de claudina, el cual también carece de la expresión de ER, PR y HER2 y se caracteriza por la baja expresión de genes involucrados en la adhesión célula-célula y la alta expresión de genes asociados con la transición epitelio-mesénquima (Fougner, et al., 2020; Lukasiewicz, et al., 2021).

La capacidad de desarrollar metástasis depende del subtipo de cáncer, de acuerdo con la clasificación intrínseca el tipo luminal A, B y HER-2 presentan reincidencia tardía con tendencia en hueso y ganglios linfáticos, mientras que el subtipo triple negativo presenta una reaparición más temprana principalmente en pulmón y cerebro (Harbeck, et al., 2019).

### **1.2.2 Tratamiento**

El tratamiento se elige dependiendo de las características moleculares e histológicas del cáncer de mama. La cirugía es la primera opción en casos de tumores operables, sin metástasis y detectados en etapas tempranas y en algunos casos esta puede ir precedida por terapia sistémica que incluye quimioterapia o terapia hormonal para reducir el tamaño tumoral o bien la terapia sistémica puede aplicarse después de la cirugía para reducir el riesgo de reaparición (Burguin, et al., 2021). Existen dos tipos de procedimiento quirúrgico: mastectomía total y parcial, en esta última se remueve solo el tejido tumoral y se conserva parte del tejido intacto, y ambos tipos de cirugía pueden ir acompañados de procedimientos de reconstrucción (Lukasiewicz, et al., 2021).

La quimioterapia es un tratamiento sistémico que puede usarse como adyuvante, si se emplea después de una mastectomía o como neoadyuvante, cuando se administra previo

a la cirugía. Los fármacos más utilizados como quimioterapia son el carboplatino, la ciclofosfamida, los taxanos y las antraciclinas. Sin embargo, la principal desventaja de esta terapia es que tiene múltiples efectos secundarios en las pacientes. Por otra parte, la radioterapia es un tratamiento local que generalmente se aplica después de la mastectomía y/o en conjunto con la quimioterapia (Moo, et al., 2019; Burguin, et al. 2021).

Las terapias hormonales también pueden usarse como terapia neoadyuvante o adyuvante y se utiliza en cáncer de subtipo luminal. En este tipo de terapias se emplean fármacos para bloquear a los receptores de hormonas o para disminuir los niveles de estrógeno para evitar que estimulen a las células cancerosas (Burguin, et al., 2021)

En los subtipos luminal A y B se tiene como primera opción la cirugía y dependiendo de si el cáncer es de alto riesgo de aparición se requiere de quimioterapia, si no es así sólo se utiliza terapia hormonal. Para los subtipos triple negativo y HER2+ se recomienda quimioterapia antes y después de la cirugía y dependiendo de la presencia de otros marcadores puede ir acompañada de anti-HER2 (Harbeck, et al., 2019).

Por otro lado, casos de cáncer de mama con tumores inoperables o cáncer de mama metastásico en hueso, pulmón o hígado son tratables pero incurables teniendo como principal causa de muerte la metástasis, por lo tanto, el tratamiento principalmente va dirigido a aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida (Harbeck, et al., 2019). La radioterapia es una opción para mitigar síntomas provocados por las metástasis en hueso, cerebro y tejido blando, además se ha observado que tratar el tumor primario con radiación puede generar una respuesta sistémica que actúe sobre células tumorales distantes, lo cual es un efecto beneficioso y útil para las terapias combinadas con inmunoterapia (Moo, et al., 2019).

### **1.3 Respuesta inmune contra el cáncer**

El concepto de inmunoección fue propuesto por Schreiber y colaboradores para explicar el proceso responsable de la eliminación de tumores y de la modificación del fenotipo inmunogénico de los tumores que conllevan al escape y desarrollo del tumor (Dunn, et al., 2002). La inmunoección consiste en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape, sin embargo, no necesariamente todas las células tumorales pasan por las tres etapas (Schreiber, et al., 2011).

La primera etapa es la de eliminación, en la cual la respuesta innata y la inmunidad adaptativa se encargan de detectar tumores en desarrollo y de eliminarlos (Schreiber, et

al., 2011). Las células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen gran participación en esta etapa al reconocer y eliminar a las células de cáncer más inmunogénicas. Las primeras secretan CCL5 y XCL1 que promueve el reclutamiento de células dendríticas convencionales que incrementan la presentación de antígeno y activación de los linfocitos T (González, et al., 2018). Una etapa de eliminación efectiva depende de la tasa de crecimiento del tumor, del lugar anatómico en dónde se desarrolla y del origen del tumor (Schreiber, et al., 2011).

Después de la etapa de eliminación, si existen células tumorales sobrevivientes, pueden pasar a la etapa de equilibrio. Ésta comprende el control del crecimiento tumoral por parte del sistema inmune, manteniendo a las células de cáncer residuales de la fase anterior en un estado de inactividad. Esta etapa es la más larga y puede mantenerse durante toda la vida del paciente (Schreiber, et al., 2011).

Finalmente, se puede iniciar la etapa de escape cuando el tumor logra evitar los mecanismos de reconocimiento y destrucción del sistema inmune. El escape depende de alteraciones que permitan evitar el reconocimiento del tumor, como la pérdida en la expresión de antígenos o de alteraciones que proporcionan resistencia a los efectos citotóxicos como la inducción de mecanismos anti apoptóticos. La pérdida en la expresión de antígenos se puede generar mediante tres mecanismos principales: surgimiento de células que carecen de determinados antígenos, pérdida o disminución en la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) o mediante la pérdida del funcionamiento en la maquinaria de procesamiento de antígeno. Esto genera una selección y proliferación de células tumorales poco inmunogénicas que no pueden ser reconocidas por el sistema inmune. La inmunosupresión en el microambiente tumoral también contribuye al escape. Se obtiene por la secreción de citocinas supresoras como IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 y VEGF por parte de los macrófagos asociados a tumor y los linfocitos T reguladores; expresión de los inmunocheckpoints inhibitorios (PD-L1 y CTLA-4) y el reclutamiento de linfocitos T reguladores, macrófagos asociados al tumor y células supresoras derivadas mieloides. La secreción de estas citocinas supresoras inhibe la secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas e inhiben la respuesta Th1 y la función de las células NK (González, et al., 2018).

#### **1.4 Inmunoterapia en cáncer**

La inmunoterapia tiene como objetivo estimular a los componentes del sistema inmune para generar una respuesta contra el tumor. Este tipo de terapia ha surgido a partir de la necesidad de encontrar tratamientos más específicos y efectivos para los pacientes. La

inmunoterapia se clasifica, de acuerdo con su mecanismo de acción para generar una respuesta inmune antitumoral, en activa y pasiva (Sahu & Suryawanshi, 2021; Sambhi, et al., 2019). Otra clasificación adicional divide la inmunoterapia en específica o no específica dependiendo de si la respuesta generada va dirigida a antígenos específicos o si es una respuesta generalizada (Henriques, et al., 2021).

En la inmunoterapia pasiva se genera una respuesta *in vitro* y después es transferida de vuelta al paciente como en la terapia adoptiva de transferencia de células y con anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos del tumor. Mientras que en la inmunoterapia activa la respuesta se genera *in situ* utilizando vacunas, citocinas, inhibidores de *checkpoints* inmunológicos (Sahu & Suryawanshi, 2021; Galluzzi, et al., 2014).

Los primeros tratamientos de inmunoterapia aprobados para utilizarse en cáncer de mama fueron los anticuerpos monoclonales. Existen al menos tres anticuerpos dirigidos contra HER2 autorizados para utilizarse en combinación con quimioterapia (Trastuzumab, Pertuzumab y Margetuximab) y actualmente son el tratamiento de elección para pacientes con cáncer de mama HER2+ en etapas tempranas y avanzadas (Henriques, et al., 2021). Otro enfoque de tratamiento con estos anticuerpos se obtiene al fusionarlos con citotoxinas que actúan sobre los microtúbulos de células HER2+, reduciendo así la toxicidad de estos fármacos en células que no expresan dicha proteína.

Los inhibidores de *checkpoints* inmunológicos (ICI), son anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas como PD-1, PD-L1 y CTLA-4 las cuales son reguladores que modulan negativamente las respuestas inmunes. Estas moléculas pueden estar presentes en los linfocitos T activados como es el caso de PD-1 y CTLA-4 se unen a antígenos expresados en células tumorales como el PD-L1 limitando así la función efectora de los linfocitos T (Henríquez, et al., 2021; Inthagard, et al., 2019).

Sin embargo, el tratamiento con los ICI tiene una efectividad que va del 15-30% en la mayoría de los tipos de cáncer y sólo en melanoma se ha observado hasta del 80%. Por lo cual, se han probado en combinación con otros ICI o con otros tratamientos como la vacunas de neoantígenos (Esfahani, et al., 2020).

### **1.5 Anticuerpos anti-idiotipo**

Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por los linfocitos B como respuesta a un antígeno. Se componen de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada par de cadena pesada y ligera posee un dominio de inmunoglobulina variable (V) en los

primeros 110 aminoácidos de su extremo amino terminal. Los dominios variables de ambas cadenas (VH y VL) forman la región variable la cuál determina la especificidad de unión al antígeno (Murphy & Weaver; 2017). Los dominios variables son únicos en cada inmunoglobulina y en cada dominio la variabilidad se concentra en tres segmentos designados como regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés *complementarity-determining regions*) y a la estructura que forma el CDR de los dominios variables se le conoce como idiotopo (Kieber-Emmons, et al., 2012; Murphy & Weaver; 2017). La asociación de dos dominios V forma al idiotipo, el cual es un conjunto único de idiotopos (Requena, et al., 2012).

El término idiotipo se refiere a la colección de idiotopos contenidos en una inmunoglobulina y se localizan en las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas. Se generan somáticamente y pueden reconocerse como extraños porque se encuentran en muy baja cantidad para generar tolerancia (López, et al., 2012). La teoría de la red de idiotipo fue propuesta por Niels Jerne en 1974. En esta describía que el sistema inmune comprende una red regulatoria de anticuerpos (Ab1) y sus anti-anticuerpos (Ab2). Jerne describió dos tipos de Ab2s: Ab2 $\alpha$  el cual se une a un sitio cerca del sitio de unión al antígeno del Ab1 y Ab2 $\beta$  el cual se une al CDR y por lo tanto contiene la imagen interna del antígeno original (Kieber-Emmons, et al., 2012).

Posteriormente, el concepto de mimetismo molecular surgió a partir de que Lindemann describiera por primera vez la posibilidad de que anticuerpos anti-idiotipo pudieran mimetizar al antígeno original (Kieber-Emmons, et al., 2012), basándose en la idea de que tanto el antígeno como el idiotipo del Ab2 se unen al sitio de unión al antígeno del Ab1, por lo que el sitio de unión del Ab2 será estructuralmente similar al antígeno (López, et al., 2012). Adicionalmente la exposición al Ab1 no sólo es capaz de generar Ab2 si no también de producir ADCC. Más tarde, Jerne incorporó estos conceptos de mimetismo molecular e imagen interna en su teoría de la red de idiotipo (Kieber, et al., 2012). El concepto de mimetismo molecular permitió el surgimiento de la idea de la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra un ligando de competir con su receptor real, y a su vez estos anticuerpos anti-ligando podrían servir como molde para formar anticuerpos anti-idiotipo que mimetizarían al ligando original (Linthicum & Farid, 1988).

### **1.5.1 Inmunoterapia basada en los idiotipos**

A partir de la teoría de la red inmunológica, han surgido estrategias terapéuticas alternativas para diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, que no utilizan directamente al antígeno

para producir una respuesta inmune. Existen estudios que buscan demostrar que el anticuerpo Ab2 $\beta$  mimetiza estructuras tridimensionales del antígeno original, induciendo una respuesta inmune similar a la que genera el antígeno nominal. Las vacunas anti-idiotipo son un ejemplo de inmunoterapia activa basada en idiotipos que no requiere utilizar directamente al antígeno para producir una respuesta inmune y así busca evitar uno de los principales problemas que enfrenta el desarrollo de vacunas contra cáncer: la tolerancia inducida por los antígenos asociados a tumor (TAAs), los cuáles son antígenos propios no mutados, pero expresados en mayor proporción en las células malignas (Foon & Bhattacharya, 2001).

El uso de idiotipos en inmunoterapia se ha propuesto bajo dos diferentes enfoques, el primero utilizando al idiotipo como antígeno blanco directamente en las células tumorales y el segundo a partir de la generación de anticuerpos anti-idiotipo para usarlos como inmunógenos que mimetizan al antígeno original (López, et al., 2012). A partir de la inmunización con anticuerpos monoclonales (Ab1) se han producido Ab2 capaces de generar respuestas antitumorales, además la inmunización con los Ab1 puede inducir también citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Bardos, 2005). Para aumentar la inmunogenicidad de los idiotipos, en algunos estudios se han empleado idiotipos acoplados con proteínas acarreadoras altamente inmunogénicas y co-administrándolos con citocinas como el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), adyuvantes, inmunógenos recombinantes y vectores virales. Otros estudios han utilizado enfoques que buscan la internalización del antígeno y facilitan el procesamiento del antígeno en las células dendríticas, uniendo el antígeno a ligandos de células dendríticas, a receptores que se internalizan o a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (López, et al., 2012). Biragyn y colaboradores, utilizaron el concepto de unir el antígeno a ligandos y fusionaron los idiotipos de dos modelos de linfoma a las quimiocinas IP-10 y MCP-3, las cuales tienen su receptor en células dendríticas, lo que facilitó la entrega y presentación del antígeno y provocó una fuerte respuesta inmune protectora contra el tumor (Biragyn et al., 1999).

Existen algunos diseños de vacunas anti-idiotipo para diferentes tipos de cáncer y utilizando diversas estrategias para inducir los anticuerpos anti-idiotipo. Está el ejemplo de Racotumomab, la cuál es la única y primera vacuna anti-idiotipo aprobada, utilizada en Cuba y Argentina. Ésta vacuna consiste en un Ab2 $\beta$  dirigido contra el anticuerpo murino anti-gangliósido glicolilado GM3, y ha demostrado ser altamente inmunogénica, segura y

eficaz. En un estudio clínico fase I realizado en pacientes con melanoma, cáncer de mama y pulmonar, Racotumomab demostró ser capaz de generar anticuerpos específicos de tipo IgM e IgG contra el gangliósido glicolilado NeuGcGM3. Posteriormente, en otro estudio clínico realizado para evaluar la eficacia terapéutica de la vacuna en pacientes con cáncer pulmonar que habían recibido quimioterapia previamente, se observó un incremento en la supervivencia promedio de los pacientes del estudio (Vázquez, et al., 2012).

Por otro lado, Bhattachary y colaboradores han generado cascadas de anticuepos anti-idiotipo para 4 antígenos tumorales humanos. En cáncer colorrectal, su vacuna anti-idiotipo (anticuerpo anti-Id que mimetiza un epítipo específico de CEA) fue probada en ensayos clínicos con pacientes y demostró que es capaz de generar respuestas humorales y celulares de tipo Th1 con secreción significativa de IFN- $\gamma$ . Además, la vacuna fue capaz de generar el Ab3 que demostró unirse a los mismos epítopos que Ab1 (Bhattachary, et al. 1990).

Adicionalmente, algunos estudios han sugerido que los anti-idiotipos pueden mediar respuestas celulares. En un estudio se realizaron ensayos de citotoxicidad con linfocitos T CD8<sup>+</sup> generados en ratones a partir de la inmunización con una proteína hemaglutinina viral. Se observó que estos linfocitos fueron capaces de reconocer y lisar tanto a células B que expresaban anticuerpos anti-idiotipo de la hemaglutinina, fragmentos variables de las cadenas ligeras y pesadas del anti-idiotipo, así como células con mimotopos del anti-idiotipo cargados exógenamente (Vani, et al. 2007). En modelos murinos de linfoma de células B, en dónde se ha aplicado la inmunización con vacunas anti-idiotipo de DNA o péptidos sintéticos se ha encontrado que la protección inducida se debe a la participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (López, et al., 2012). Más recientemente, en un estudio clínico en dónde probaron una combinación de dos anticuerpos monoclonales anti-Id murinos dirigidos contra dos epítopos diferentes del antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma, se indujeron CTLs capaces de lisar células de melanoma (Kohler, et al., 2019).

#### **1.5.1.1 Tratamientos con anticuerpos anti-idiotipo en cáncer de mama**

En cáncer de mama se han propuesto tratamientos con anticuerpos anti-idiotipo y algunos se han evaluado tanto en modelos animales como en ensayos clínicos. Tal es el caso de Racotumomab, una vacuna anti-idiotipo que consiste en un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo dirigido contra el Ab1 monoclonal P3, que reconoce gangliósidos glicolilados (NeuGcGM3) (Vázquez, et al., 1998). El grupo de trabajo que desarrolló esta vacuna planteó que Racotumomab era capaz de actuar como antígeno sustituto del gangliósido

glicolilado generando anticuerpos que puedan reaccionar con el Ab2 y con gangliósidos glicolilados (Vázquez, et al., 2012). Para probar esta hipótesis se realizaron estudios en pollos, ratones y monos. Los primeros estudios en ratones mostraron que la inmunización con Racotumomab era capaz de inducir una respuesta de Ab3 capaz de bloquear la unión de Racotumomab al Ab1, sin embargo, los Ab3 no tenían la misma especificidad que el Ab1, por lo que se determinó que Racotumomab no contenía la imagen interna del Ab1 (Vázquez, et al., 1998).

No se observó respuesta hacia el antígeno original en monos y ratones debido a que, los gangliósidos glicolilados se encuentran en tejido normal, por lo que son moléculas sometidas a tolerancia (Vázquez, et al., 2012). Mientras que, en pollos si se observó la generación de una respuesta específica hacia el gangliósido de interés (Hernández, et al., 2005)

Posteriormente evaluaron su efecto en modelos murinos de cáncer (Vázquez, et al., 2012). Previo al implante con células de la línea de carcinoma mamario F3II, inmunizaron ratones con 3 dosis intraperitoneales de Racotumomab acoplado a hemocianina de lapa californiana (*Megathura crenulata*) (KLH, por sus siglas en inglés *Keyhole Limpet Hemocyanin*) como adyuvante y aplicaron 4 dosis posteriores al implante. El tumor creció en todos los grupos evaluados, pero observaron una disminución en el crecimiento tumoral y en la formación de metástasis en el pulmón en los grupos inmunizados con Racotumomab/KLH, en comparación con el grupo control y los grupos inmunizados únicamente con Racotumomab o el adyuvante (Vázquez, et al., 2012). En estudios posteriores en este mismo modelo de cáncer de mama se empleó Racotumomab en combinación con ciclofosfamida y observaron reducción en angiogénesis y en la proporción de células supresoras mieloides granulocíticas en bazo (Gajdosik, 2014).

Por otro lado, se ha evaluado la inmunogenicidad y seguridad de Racotumomab en ensayos clínicos de fase I en pacientes con cáncer de mama en etapa III o IV y con metástasis. En un primer estudio se administró Racotumomab con hidróxido de aluminio vía intradérmica, a pacientes con cáncer de mama en etapa III/IV cada 2 semanas hasta alcanzar 6 dosis. En 8 de 9 pacientes se observaron respuestas de IgG e IgM específicas hacia el NeuGcGM3 (Gajdosik, 2014). Posteriormente, en otro estudio en pacientes con cáncer de mama metastásico se evaluaron diferentes dosis de la vacuna. Se administraron 6 dosis intradérmicas cada 2 semanas, seguido de una fase de mantenimiento con 10 dosis, aplicadas mensualmente, hasta completar un año de tratamiento (Guthmann, et al., 2006).

En general, los pacientes toleraron bien la vacuna, sólo presentaron algunas reacciones cutáneas y se indujo una respuesta específica hacia NeuGcGM3, así como una respuesta específica de tipo Th1 en 40% de los pacientes (Gajdosik, 2014). De manera interesante, cuando Racotumomab fue administrado en pacientes con melanoma avanzado en un ensayo clínico de fase I, fue capaz de inducir una respuesta específica de Ab3 contra los N-glicolípidos gangliósidos. Con este resultado demostraron que, a diferencia de lo observado previamente en animales, en humanos Racotumomab sí actúa como Ab2 con la imagen interna del Ab1 (Díaz, et al., 2003).

Otra estrategia de tratamiento son los anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra Her2/neu. En un modelo murino de cáncer con células transfectadas para expresar Her2/neu fue capaz de inducir respuestas celulares, humorales y también confirió protección contra el reto de una dosis letal de células tumorales her2+. Se observó que los Ab3 generados a partir de la inmunización con 6D12 fueron capaces de reconocer al antígeno original, incluso en una línea celular de cáncer de mama humano (SK-BR3) (Mohanty, et al., 2007).

Finalmente, se han empleado los anticuerpos anti-idiotipo como antagonistas de receptores hormonales involucrados en el desarrollo del cáncer de mama. Tal es el caso del anticuerpo anti-idiotipo *AK98*, diseñado por Wenbin y colaboradores, capaz de unirse a la insulina ya que mimetiza al epítipo de unión al receptor de la insulina. En dicho estudio demostraron que el anticuerpo *AK98* es capaz de unirse al receptor de insulina e inhibir la señalización de este, además observaron una tendencia a disminuir la proliferación inducida por insulina en células de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Wenbin, et al., 2020).

## 2 Antecedentes

La inmunogenicidad de los anticuerpos se ha observado en terapias con anticuerpos monoclonales (mAb) capaces de inducir respuestas de anticuerpos tipo ADAs (*Anti-Drug Antibodies*) mediante la activación de los linfocitos T por los epítomos antigénicos de los mAb y la posterior estimulación de los linfocitos B (Liang & Zhang, 2020; Harding, et al., 2010). Tal es el caso del primer anticuerpo monoclonal aprobado para uso terapéutico por la FDA, OKT3 dirigido contra el CD3 de los linfocitos T, en donde un porcentaje significativo de los pacientes que fueron tratados con OKT3 desarrollaron anticuerpos humanos anti-ratón (Davda, et al., 2019).

Desde entonces se han desarrollado anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos que lograron reducir en algunos casos la incidencia de ADAs (Almagro, et al., 2018). Para la formación de anticuerpos humanizados se transfieren los CDRs de anticuerpos murinos a regiones variables de anticuerpos humanos y son producidos en ratones transgénicos o mediante *phage-display* como Adalimumab, el primer anticuerpo completamente humano aprobado para uso terapéutico. Sin embargo, el tratamiento con Adalimumab ha reportado entre 5-86% de incidencia en formación de ADAs (Harding, et al., 2010). Esto sugiere que los péptidos de los CDRs contenidos en las regiones variables de los anticuerpos contienen epítomos con la capacidad de inducir la formación de ADAs y anticuerpos anti-idiotipo mediante la activación de la red de anticuerpos idiotipo/ anti-idiotipo, además podrían actuar como neoantígenos al no estar sometidos a tolerancia central (Talotta, et al., 2019; Odales, et al., 2020).

En comparación con otras estrategias evaluadas como terapias contra el cáncer, el enfoque de utilizar a los mimótopos de los CDRs de los anticuerpos ha mostrado resultados favorables para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (Vani, et al., 2007; López, et al., 2012). Los mimótopos son péptidos que mimetizan epítomos de un antígeno nominal y basados en la reactividad cruzada de los TCRs pueden inducir la activación de linfocitos T (Slansky & Nakayama, 2020). Se ha probado la efectividad de mimótopos, obtenidos mediante sustituciones de uno o varios aminoácidos que puedan mejorar la interacción MHC-TCR o la estabilidad de la unión péptido-MHC, en diferentes tipos de cáncer (Burhman & Slansky, 2013). En pacientes con melanoma que fueron vacunados con mimótopos de la glicoproteína gp100 de melanoma se observaron respuestas de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , mientras que en el modelo CT26 de cáncer colorrectal murino se observaron

respuestas celulares específicas contra al antígeno natural AH1 inducidas por el mimótopo A5 (Slansky & Nakayama, 2020; Jordan et al., 2010).

El empleo de mimótopos es una opción para superar la tolerancia inducida hacia los epítomos tumorales en el desarrollo de vacunas contra cáncer, debida a la eliminación de linfocitos T con avidéz alta por MHC propios, impidiendo respuestas hacia antígenos tumorales derivados de proteínas propias como los antígenos asociados a tumor (TAAs) o los neoantígenos. Estos últimos son péptidos alterados derivados de mutaciones somáticas y sólo se expresan en células tumorales, por lo que han resultado atractivos para el diseño de vacunas contra cáncer más específicas y con menos efectos tóxicos. Sin embargo, se ha observado que son poco inmunogénicos y a pesar de que es posible predecir los péptidos con alta afinidad al MHC-I sólo del 20-30% son capaces de inducir naturalmente respuestas celulares de linfocitos T y la mayoría son respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Zhang, et al., 2019).

Por otro lado, las inmunoglobulinas se han utilizado como vehículos para insertar péptidos en sus CDRs. Por ejemplo, en el diseño de una molécula inmunogénica en dónde los CDR de la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina humana fueron reemplazados por un epítomo de *Taenia crassiceps* exhibida en la superficie del bacteriófago M13. Esta construcción se administró en ratones BALB/c y se observó protección contra la infección (Manoutcharian, et al., 1999). En otro estudio, se diseñó una vacuna de DNA denominada *Immunobody* en dónde reemplazaron epítomos de linfocitos T citotóxicos y cooperadores en los CDRs de inmunoglobulinas G humanas. En sus resultados observaron que los epítomos eran presentados eficientemente y se obtenía respuestas antitumorales (Metheringham, et al., 2009).

A partir del concepto de mimetismo molecular existen propuestas de inmunoterapias basadas en idiotipos, entre ellas vacunas anti-idiotipo. Racotumomab, es la única vacuna anti-idiotipo aprobada para utilizarse como tratamiento en cáncer de pulmón de células no pequeñas en Argentina y Cuba. Con esta vacuna han observado que los pacientes generan respuestas de anticuerpos hacia el gangliósido expresado en las células tumorales después de ser inmunizados y las células tumorales pueden eliminarse mediante un mecanismo no apoptótico independiente de la activación del complemento (Vázquez, et al., 2012; Alfonso, et al., 2014).

Las terapias anti-idiotipo que se han evaluado en trabajos previos se generan a partir de anticuerpos monoclonales y van dirigidas a un antígeno en específico. Por tal motivo, el desarrollo de un tratamiento contra el cáncer con anticuerpos anti-idiotipo policlonales resulta una idea atractiva porque representan un repertorio más amplio de los antígenos presentes en el tumor. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó si el tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo policlonales tiene efecto antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama.

### **3 Hipótesis**

La presencia de un tumor de células 4T1 generará anticuerpos específicos dirigidos hacia moléculas del tumor (Ab1). La inmunización de ratones sanos con estos anticuerpos anti-4T1 (Ab1) generará anticuerpos específicos (Ab2) dirigidos hacia los idiotipos de los anticuerpos anti-4T1 con la imagen interna de antígenos del tumor. Por lo tanto, el tratamiento en un modelo murino de cáncer de mama con los anti-anticuerpos (Ab2) que contienen mimótopos del tumor 4T1 en sus CDRs, será capaz de inducir una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que inhibirá el crecimiento tumoral.

## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> inducida por los mimótopos contenidos en los CDRs de anticuerpos anti-idiotipo policlonales generados a partir de anticuerpos anti-4T1.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Purificar anticuerpos anti-4T1 (Ab1) de ratones con cáncer de mama
- Generar anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) a partir de la inmunización de ratones sanos con los anticuerpos anti-4T1 (Ab1)
- Evaluar la respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> inducida por los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) inmunizando ratones con Ab1 y Ab2.

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Implante de la línea tumoral 4T1 en ratones BALB/c

Se utilizó la línea tumoral 4T1 de adenocarcinoma mamario (American Type Culture Collection), la cual genera tumores TNBC y asemeja mucho a este tipo de tumores en humano (Schrörs, 2020). Las células se mantuvieron *in vitro* en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1% de anti-anti a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se tomaron 10<sup>5</sup> células tumorales 4T1 viables en un volumen de 100 µL de PBS y se implantaron en la glándula mamaria derecha de ratones hembra de 15 semanas de edad de la cepa BALB/cAnN. Pasados 30 días los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de suero de ratones que desarrollaron tumor. Así mismo, se obtuvieron muestras de suero de ratones sanos de la misma edad como control negativo.

### 5.2 Purificación de anticuerpos específicos contra el tumor 4T1 (Ab1) por cromatografía de afinidad con proteína G

Se empleó una columna empacada con 1 mL de suspensión de proteína G- acoplada a agarosa (Roche cat. 11 719 416 001) a la cual se le realizaron 3 lavados con buffer de lavado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 150 Mm, EDTA 2 mM, pH=7) y posteriormente se equilibró con buffer de unión (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH=7). El suero obtenido de los ratones BALB/c se diluyó en buffer de unión y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente o por 12 horas a 4°C en la columna con proteína G. Pasado el tiempo de incubación se recolectó la fracción de suero no unido (1 mL) y posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de lavado. Se verificó la absorbancia de los lavados a 280 nm, hasta que fuera menor a 0.1. Se eluyeron los anticuerpos con buffer de elución (Glicina 100 mM pH 2.7). Se recolectaron 5 fracciones de 1 mL de los anticuerpos en un tubo con 30 µL de buffer de neutralización (Tris 1 M pH 8) o una fracción de 9 mL en un tubo con 270 µL de buffer neutralizante. La absorbancia de las fracciones recolectadas se leyó a 280 nm. Se adicionaron 5 volúmenes de buffer de elución para lavar la columna y finalmente se adicionaron 8 volúmenes de buffer de unión para restablecer el pH de la columna. Para almacenar la columna se agregó buffer de unión con etanol al 20%. Los anticuerpos purificados se dializaron con membranas de diálisis de 25 kDa o en unidades de ultrafiltración (Vivaspin cat. VS1522). La concentración de las muestras más diluidas se realizó en el equipo Speed Vac SPD1010 (cat. SPD1010-115). La concentración de los anticuerpos se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el siguiente factor:

1 unidad de absorbancia= 0.8 mg de IgG. Los anticuerpos fueron filtrados con filtros de 0.22 µm y almacenados a 4°C hasta su uso.

### **5.3 Generación y purificación de anticuerpos anti-idiotipo contra el Ab1 (Ab2)**

Para la generación de los Ab2 se inmunizaron ratones macho de 5 a 6 semanas de edad de la cepa BALB/cAnN sanos con 100 µg de anticuerpos purificados de los ratones con tumor (Ab1) con adyuvante completo de Freund (Sigma cat. 5881) por vía intraperitoneal. Se aplicó un primer refuerzo de 100 µg de anticuerpos purificados con adyuvante incompleto de Freund (Sigma cat. 5506) 21 días después de la primera inmunización y al día 42 se aplicó un segundo refuerzo de 50 µg de anticuerpo purificado. Los ratones se sangraron 9 días después del segundo refuerzo. Se obtuvieron los sueros por retracción del coágulo y centrifugando dos veces a 12 000 rpm por 10 minutos. Los sueros se alicuotaron y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Las inmunoglobulinas G totales generadas contra el Ab1 se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína G como ya se describió en el apartado anterior.

### **5.4 Evaluación de la integridad, pureza y especificidad de los anticuerpos**

La integridad y pureza de los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad se verificó por electroforesis en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % y se utilizó un marcador de peso molecular de amplio intervalo (BioRad cat. 161-0317). Las muestras se diluyeron en buffer de carga 4x (Tris-HCl pH 6.8, 2-β-mercaptoetanol, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol) y se incubaron por 10 minutos a 95°C. Posteriormente las muestras se colocaron en hielo previo a cargarse en el gel y se corrieron con buffer de migración (Tris base, SDS, Glicina; pH 8.3) durante 45 minutos a 20 mA. Se realizó un Western blot para confirmar que las proteínas purificadas eran IgG. Se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Thermo Fisher cat. G21060) y el sustrato de revelado BCIP/NTP (Life technologies cat. 002209).

### **5.5 Evaluación de la respuesta inmune inducida por los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2)**

El manejo de la línea tumoral 4T1 se realizó como fue descrito anteriormente. Se implantaron 10<sup>4</sup> células 4T1 viables en la glándula mamaria derecha de ratones BALB/c hembra de 8 semanas. La inmunización se realizó al día 5 post implante de la línea tumoral y se administraron 100 µg de anticuerpo Ab2 con 100 µg de adyuvante Poly I:C en 100 µl de PBS por vía subcutánea. El área tumoral se midió 3 veces por semana por el producto del largo x ancho del tumor utilizando un Vernier digital (Fowler sylvac).

## **5.6 Obtención de células de bazo y de tumor**

A los 30 días post implante los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron células de bazo mediante perfusión con medio RPMI 1640. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos y posteriormente a los pellets se les adicionaron 5 mL de buffer de lisis y se incubaron durante 7 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se adicionó PBS hasta completar 14 mL, se centrifugaron a 400 g por 15 minutos y los pellets se resuspendieron en 5 mL de medio. Se contaron las células de un bazo por grupo en cámara de Neubauer y se congelaron en medio de congelación (suero fetal bovino con DMSO al 10%) de  $1 \times 10^6$  a  $8 \times 10^6$  células dependiendo del grupo al que pertenecían. Se congelaron células de 5 bazos de los grupos con más de 5 ratones. Así mismo, los tumores se disgregaron mecánicamente y las suspensiones celulares se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Las pastillas se resuspendieron en 5 mL de buffer de lisis a 37°C y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 minutos. Se agregó PBS hasta completar 14 mL y se centrifugaron a 1500 rpm por 15 minutos. Las pastillas se resuspendieron en 1.6 mL de medio de congelación y se congelaron dos alícuotas de 800  $\mu$ L de cada tumor.

## **5.7 Inmunofenotipificación de células de bazo**

Las células de bazo y tumor se descongelaron y se resuspendieron en PBS 1X. Se centrifugaron a 400 g por 10 minutos. Las muestras se decantaron, los pellets se resuspendieron y se agregó 1 mL de medio RPMI 1640 para contar las células en cámara de Neubauer. Se tomaron 250 000 células de bazo y 750 000 células de tumor para teñir. Las células se centrifugaron a 400 g 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron con los anticuerpos anti-CD3 APC-eFluor 780 (clona 145-2C11), anti-CD4 APC (clona RM4-5), anti-CD8 PE (clona 53-6.7), anti-CD11b AF 488 (clona M1/70), anti-MHC-II PECy5 (clona M5/114.15.2), anti-Ly6C PECy7 (clona HK1.4) y anti-Ly6G PE (clona RB6-8C5) en PBS 1X, 1% de suero fetal bovino y 0.1% de azida de sodio. Las muestras se incubaron 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100  $\mu$ L de PBS 1X, 1% de suero fetal bovino y 0.1% de azida de sodio para lavar y se centrifugaron a 400 g por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% y se agitaron durante 20 minutos. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Attune Azul-Rojo (Applied Biosystem) y se analizaron con el programa FlowJo10.

## **5.8 Análisis estadístico**

Se realizó en el programa GraphPad Prism 8. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar.

El crecimiento tumoral se analizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con prueba posterior de Tuckey (comparación de todos los grupos). El número de metástasis y los ensayos de citometría se analizaron mediante ANOVA de una vía con prueba posterior de Tuckey (comparación de todos los grupos).

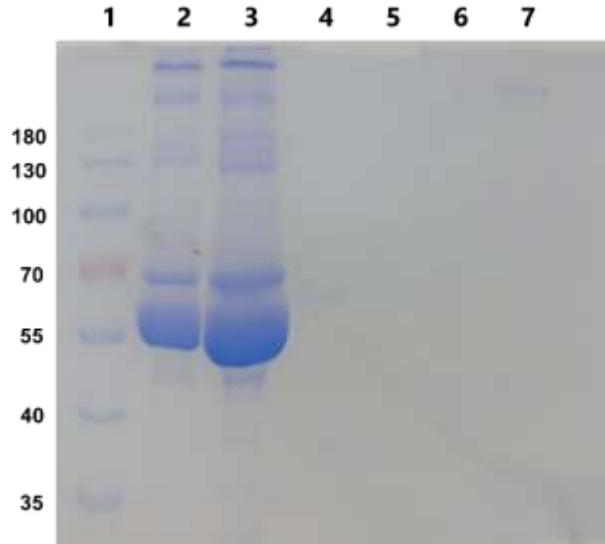
## 6 Resultados

### 6.1 Purificación de anticuerpos IgG totales (Ab1) de suero por cromatografía de afinidad con proteína G

Se realizó la purificación de anticuerpos policlonales de suero de ratones por cromatografía de afinidad con proteína G acoplada a agarosa. La proteína G es una proteína de pared celular bacteriana que se produce en *Streptococcus* y se une a la región Fc de las inmunoglobulinas de mamíferos (Pfaunmiller, et al., 2016). Tiene 2 sitios de unión a inmunoglobulinas y una capacidad de unión a un mayor espectro de subclases de IgG por lo que se recomienda para la purificación de IgG de ratón, porque permite purificar a la IgG1 que tiene muy baja o nula afinidad por la proteína A. Los sueros positivos para Ab1 fueron obtenidos de ratones BALB/c hembras implantadas con la línea celular de cáncer de mama 4T1 al día 30 posterior al implante, mientras que los sueros negativos se obtuvieron de ratones BALB/c hembra sanos.

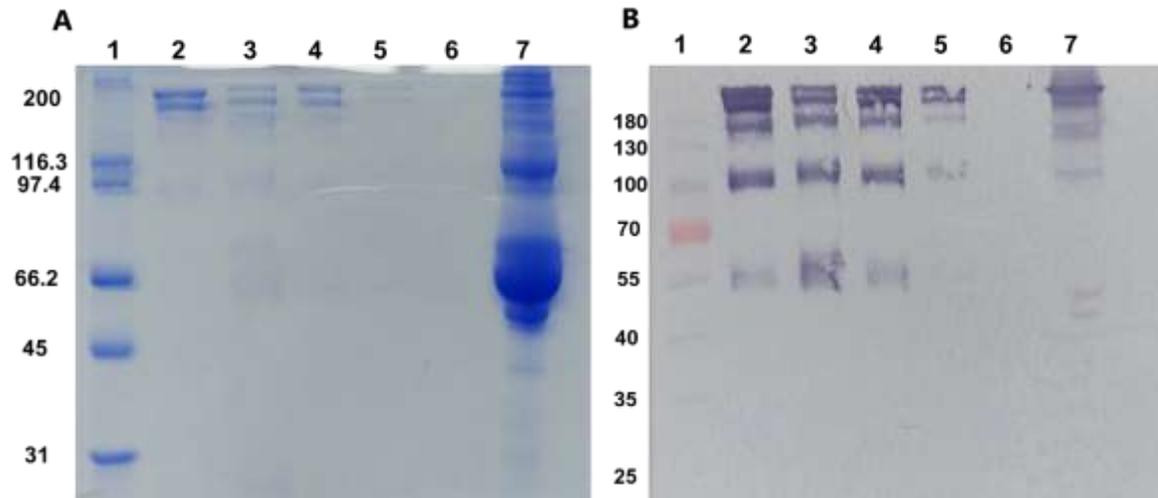


**Fig. 1** Purificación de anticuerpos de suero negativo con proteína G acoplada a agarosa. El suero se obtuvo de ratones BALB/c hembra sanos de 10 semanas. Carriles: 1 MPM; 2 No unido antes de incubar suero; 3 No unido después de incubar el suero; 4 y 5 Lavado 1 y 2; 6-13 Elución; 14 Anticuerpo dializado. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie.



**Fig. 2** Purificación de anticuerpos de suero positivo con proteína G acoplada a agarosa. El suero se obtuvo de ratones BALB/c implantados con 100 000 células 4T1 a los 30 días después del implante. Carriles: 1 MPM; 2 No unido antes de incubar suero; 3 No unido después de incubar el suero; 4, 5 y 6 Lavados 1, 2 y 3; 7 Elución. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie.

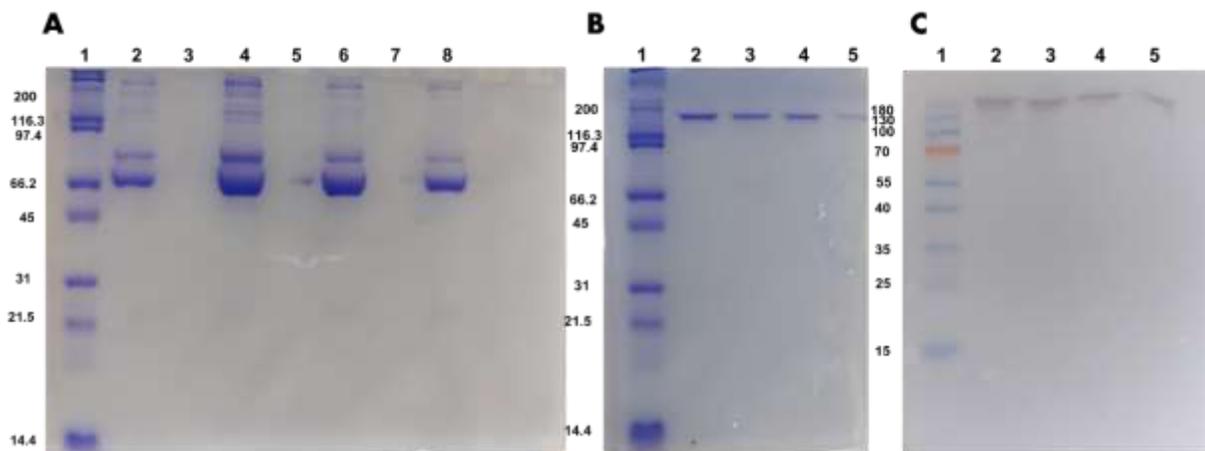
La figura 1 y 2 muestran los geles representativos de las purificaciones de anticuerpos por cromatografía de afinidad con proteína G acoplada a agarosa de sueros negativos y positivos respectivamente. Se observan las inmunoglobulinas en el peso aproximado de 150 kDa en las fracciones no unidas, lavados y eluciones. En esta purificación se obtuvieron 8 eluciones de 1 mL (carriles 6-13, Fig. 1), de acuerdo con lo reportado por la casa comercial cada subclase de inmunoglobulina tiene una afinidad diferente a la proteína G, por lo que el resultado observado en la elución y la lectura de proteína a 280 nm podría sugerir que cada fracción corresponde a una subclase de inmunoglobulina y, por tanto, el desprendimiento de éstas ocurre de forma gradual. Dado que nuestro interés era obtener las inmunoglobulinas G totales del suero, se decidió realizar las eluciones en las purificaciones posteriores en una fracción única (Fig. 2).



**Fig. 3** Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad con proteína G de suero de ratón BALB/c sanos y con tumor 4T1. Carriles: 1 MPM, 2 -4 Anticuerpo purificado de suero negativo, 5 Anticuerpo purificado suero positivo, 7 Suero control de ratón con anticuerpo no relacionado. A) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie. B) Western Blot.

Debido a la necesidad de administrar grandes dosis de inmunoglobulina por unidad de volumen en los ensayos experimentales posteriores, las fracciones dializadas fueron concentradas mediante un equipo de concentración al vacío. Sin embargo, con este método de concentración la integridad de las inmunoglobulinas no se mantenía intacta y se observó fragmentación de los anticuerpos (Fig. 3). La concentración final de las inmunoglobulinas se verificó midiendo la absorbancia a 280 nm y la integridad mediante SDS-PAGE y western blot.

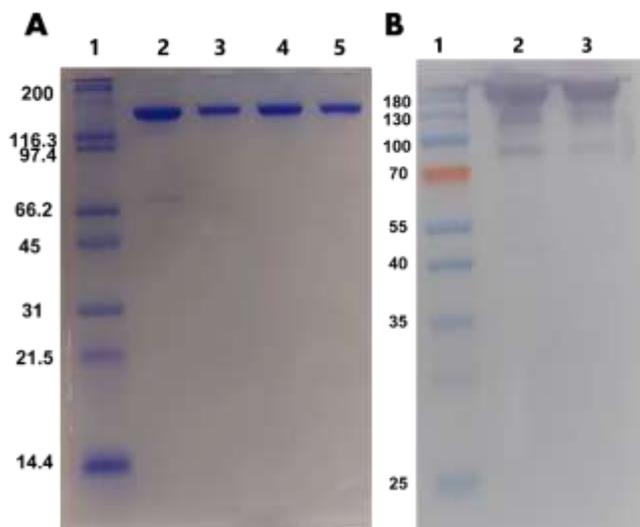
Dado que los grupos de estudio incluían tratamiento con Ab1, fue necesario realizar una segunda purificación de Ab1 de suero de ratones con tumor 4T1 y de suero de ratones sanos sin tumor para completar las dosis requeridas. Para esta segunda purificación y las purificaciones posteriores se obtuvo una sola elución de 6 mL (Fig. 4B) para facilitar el concentrado de los anticuerpos.



**Fig. 4** Purificación de anticuerpos de suero con proteína G acoplada a agarosa. El suero positivo se obtuvo de ratones BALB/c implantados con 100 000 células 4T1 a los 30 días después del implante. El suero negativo se obtuvo de ratones sanos sin tumor. A) Carriles: 1 MPM; 2, 4 primer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo 1 de suero positivo (Ab1+); 3, 5 tercer lavado de dos purificaciones independientes de suero positivo (Ab1+); 6 y 8 primer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo de suero negativo (Ab1-); 7 y 9 tercer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo de suero negativo (Ab1-). B y C) Carriles: 1 MPM; 2 y 3 Elución de dos purificaciones independientes de anticuerpo 1 de suero positivo (Ab1+); 4 y 5 Elución de dos purificaciones independientes de anticuerpo de suero negativo (Ab1-). A) y B) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. C) Western blot.

Para esta purificación y la de los anticuerpos anti-idiotipo, se utilizó un método diferente para concentrar y dializar los anticuerpos. Mediante el sistema Vivaspín fue posible concentrar las muestras en una primera centrifugación y posteriormente con una segunda centrifugación se dializaron los anticuerpos para hacer el intercambio a un buffer adecuado para la inmunización. La ultrafiltración Vivaspín es un sistema con membrana de polietilensulfona que permite una recuperación del 95% de las inmunoglobulinas G de acuerdo con lo reportado por la casa comercial.

Adicionalmente, este método permitió mantener mejor la integridad de los anticuerpos (Fig. 5) en comparación con el método por concentración al vacío en donde se obtenían a los anticuerpos fragmentados.



**Fig. 5** Purificación de anticuerpos de suero con proteína G acoplada a agarosa. El suero positivo se obtuvo de ratones BALB/c implantados con 100 000 células 4T1 a los 30 días después del implante. El suero negativo se obtuvo de ratones sanos sin tumor. El gel muestra los anticuerpos concentrados y dializados en buffer de fosfatos (PB) pH 7.4 después de la purificación. Carriles: 1 MPM; 2 Ab1 positivo dializado en PB pH 7.4; 3 Ab negativo dializado en PB pH 7.4; 4 Elución de Ab1 positivo concentrado en PB y 5 Elución de Ab negativo concentrado en PB. A) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie y B) Western Blot.

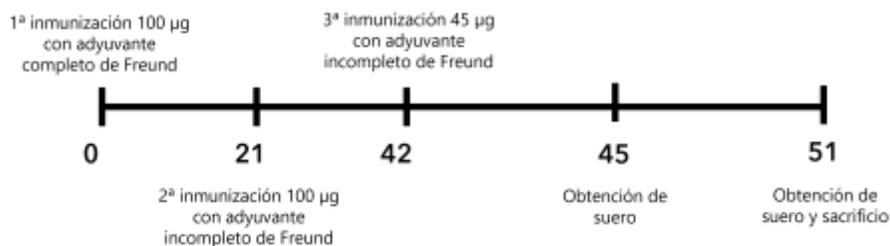
Los resultados del rendimiento y concentración obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Purificación con proteína G de anticuerpos policlonales de suero de ratón naive (negativo) y con tumor 4T1 (positivo)

Suero	Purificación	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Negativo	1	0.978
	2	0.6528
	3	0.432
Positivo	1	0.976
	2	0.789

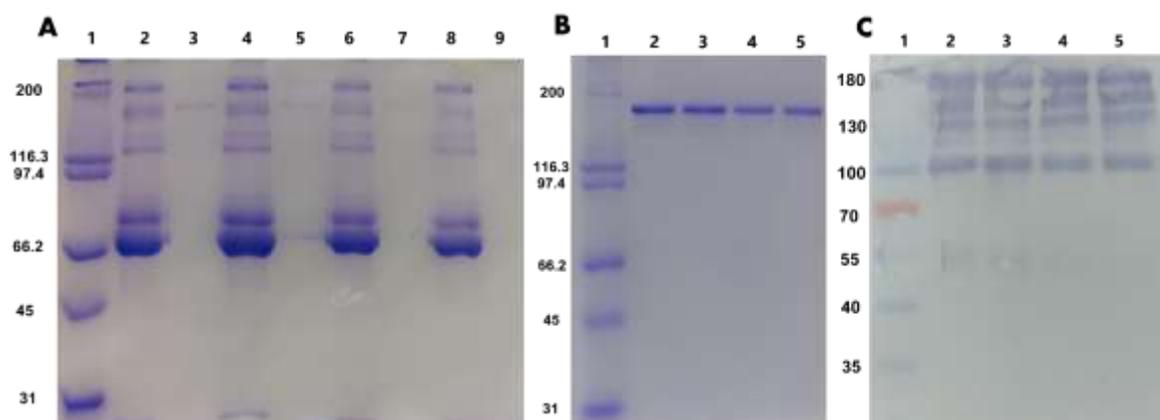
## 6.2 Purificación de los anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) mediante cromatografía de afinidad con proteína G.

Los anticuerpos policlonales IgG purificados se utilizaron para inmunizar ratones macho de la cepa BALB/c. Los ratones se inmunizaron vía intraperitoneal para generar anticuerpos anti-idiotipo de las IgG anti-4T1. Se utilizó un esquema de 3 inmunizaciones y se obtuvieron muestras de suero a los días 44 y 51 posteriores a la primera inmunización (Fig. 6).



**Fig. 6** Esquema de inmunización

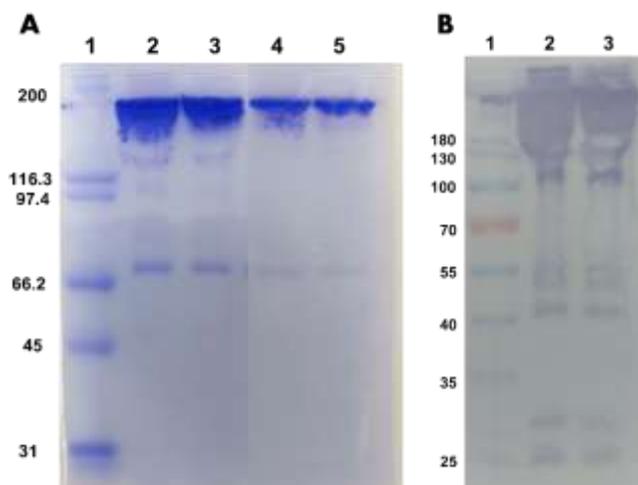
La purificación de los anticuerpos anti-idiotipo se realizó mediante cromatografía de afinidad con proteína G a partir de los sueros obtenidos en el día 51, debido a que es posible obtener anticuerpos de mayor afinidad de muestras de suero de más días posteriores a la inmunización. En la figura 7 se muestran el primer y último lavado de la columna obtenidos previos a la elución. Se observa que en el primer lavado hay presencia de proteína que no se unió a la resina, mientras que en el tercer lavado casi no se observa proteína no unida, lo cual se confirmó mediante medición de la absorbancia a 280 nm.



**Fig. 7** Purificación de anticuerpos anti-idiotipo de suero positivo con proteína G acoplada a agarosa. Ratonés BALB/c macho fueron inmunizados vía intraperitoneal con anticuerpos anti-4T1 y los sueros fueron obtenidos a los días 44 y 51 posteriores a la primera inmunización. Para la purificación se utilizaron los sueros del día 51. A) Carriles: 1 MPM; 2, 4 primer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo anti-idiotipo de suero positivo (Ab2+); 3, 5 tercer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo anti-idiotipo de suero positivo (Ab2+); 6 y 8 primer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo anti-idiotipo de suero negativo (Ab2-); 7 y 9 tercer lavado de dos purificaciones independientes de anticuerpo anti-idiotipo de suero negativo (Ab2-). B y C) Carriles: 1 MPM; 2 y 3 Elución de dos purificaciones independientes de anticuerpo anti-idiotipo de suero positivo (Ab2+); 4 y 5 Elución de dos purificaciones independientes de Ab2 de suero negativo (Ab2-). A y B) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. C) Western Blot.

Nuevamente las eluciones se obtuvieron de 6 mL para facilitar el paso de concentración. En la figura 7B se muestra el gel de las eluciones, en las cuáles se observa una banda

cercana a los 150 KDa correspondiente a las IgG. Posteriormente las eluciones fueron concentradas y dializadas en buffer de fosfatos pH 7.4 utilizando el sistema vivaspin y se evaluó la integridad de las proteínas mediante SDS-PAGE. Por último, se confirmó que las proteínas purificadas eran IgG mediante un western blot (Fig. 8).



**Fig. 8** Purificación de anticuerpos anti-idiotipo de suero positivo con proteína G acoplada a agarosa. Ratones BALB/c macho fueron inmunizados vía intraperitoneal con anticuerpos anti-4T1 y los sueros fueron obtenidos a los días 44 y 51 posteriores a la primera inmunización. Los anticuerpos fueron purificados de los sueros del día 51 con una columna de proteína G acoplada a agarosa. El gel muestra los anticuerpos concentrados y dializados en buffer de fosfatos (PB) pH 7.4 después de la purificación. Carriles: 1 MPM; 2 Ab2 positivo dializado en PB pH 7.4; 3 Ab2 negativo dializado en PB pH 7.4; 4 Elución de Ab2 positivo concentrado en PB y 5 Elución de Ab2 negativo concentrado en PB. A) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie y B) Western blot.

En la siguiente tabla se muestran los rendimientos de las purificaciones de los anticuerpos anti-idiotipo. Las concentraciones obtenidas de la purificación fueron suficientes para inmunizar 8 ratones con Ab2+ y 8 ratones de Ab2- (anticuerpo control negativo) con dosis únicas de 100 µg.

Tabla 3. Rendimiento de la purificación de Ab2 positivo y negativo

Anticuerpo anti-idiotipo	Concentración (µg/µL)
Positivo (Ab2+)	1.584
Negativo (Ab control negativo)	1.2032

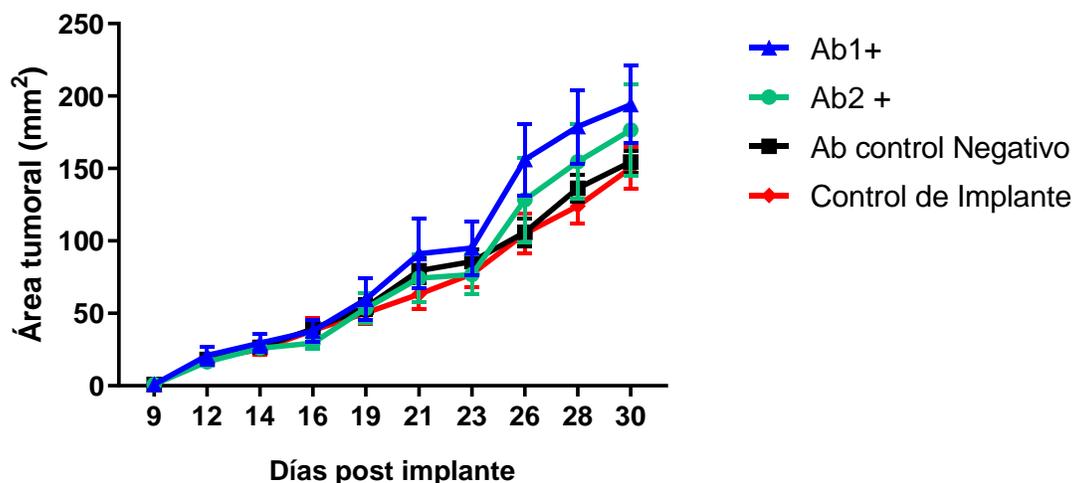
El método de purificación con proteína G, resultó ser el más eficiente para obtener la concentración de anticuerpo requerida para los ensayos de inmunización posteriores. Sin embargo, hay que considerar que la utilización de las proteínas con afinidad por las inmunoglobulinas como la A o G para la purificación de anticuerpo, presenta ciertas

desventajas como el alto costo, la baja reutilización de la resina, agregación o degradación de los anticuerpos por las condiciones ácidas de elución y baja afinidad de los anticuerpos a la resina (Murphy, et al. 2016).

### 6.3 Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo

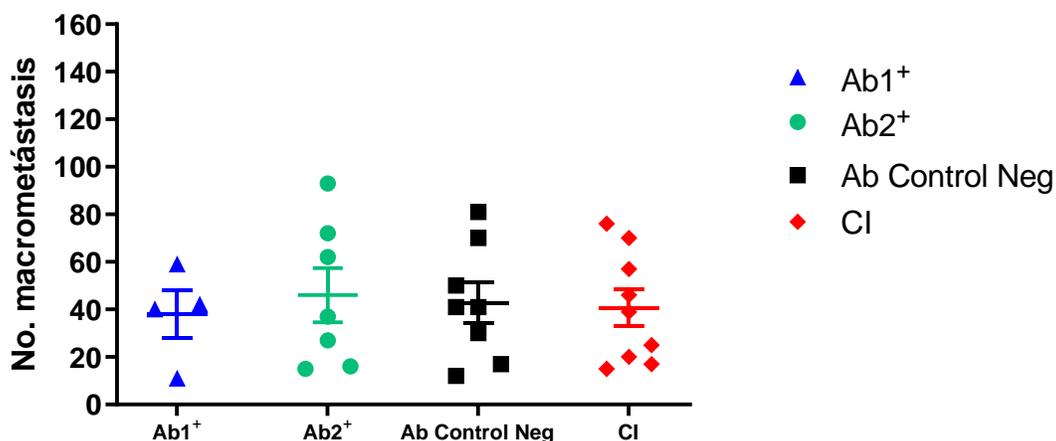
Los anticuerpos purificados se administraron como tratamiento por vía subcutánea al día 5 posterior al implante con células 4T1 en ratones BALB/c hembra. El efecto antitumoral del tratamiento con los anticuerpos idiotipo y anti-idiotipo se evaluó mediante el monitoreo del crecimiento tumoral, el conteo de las macrometástasis en pulmón al día 30 y la inmunofenotipificación de las poblaciones celulares infiltrantes en bazo y tumor.

La medición del área tumoral se realizó a partir del día 9 posterior al implante y hasta el día 30. Como se observa en la figura 9, el tratamiento con el anticuerpo anti-idiotipo (Ab2+) no disminuyó el tamaño del tumor con respecto a los grupos de tratamiento control negativo y el grupo control de implante. En el caso del grupo tratado con anticuerpos anti-4T1 (Ab1+) el área tumoral observada fue de mayor tamaño incluso que la del grupo control de implante. Adicionalmente, el tratamiento con anticuerpo control negativo mostró un comportamiento similar al grupo control de implante.



**Fig. 9** Evaluación del efecto antitumoral del tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo. Ratones hembra BALB/c de 7-8 semanas de edad fueron implantados con 10000 células de la línea celular de cáncer de mama 4T1 en la glándula mamaria derecha. En el 5to día post-implante fueron inmunizados vía subcutánea con 100 µg de cada tratamiento. El área tumoral se midió hasta el día 30 post-implante mediante dos mediciones perpendiculares del tumor (ancho\*largo). En el grupo control de implante n=9, en Ab2+ n=7, en Ab1+ n=4 y en Ab control negativo n=8.

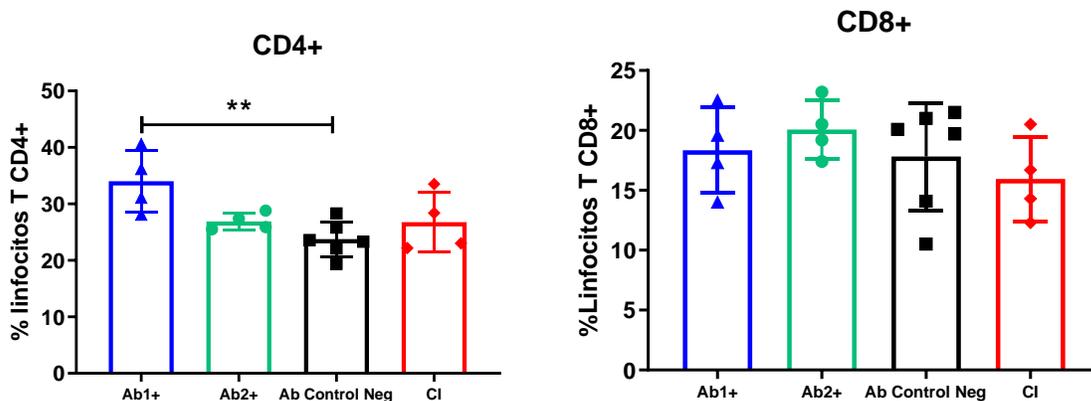
Por otro lado, este modelo de cáncer de mama 4T1 se caracteriza por inducir metástasis espontáneas en pulmón desde el tumor primario. Al día 30, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones. Se contaron las macrometástasis en la superficie de los pulmones y se comparó el promedio entre tratamientos. En la figura 10 se observa que en ninguno de los grupos positivos de tratamiento hubo una disminución en el número de macrometástasis con respecto a los grupos control negativo y control de implante.



**Fig. 10** Efecto del tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo en el número de macrometástasis en pulmón. Ratones BALB/c hembra de 7-8 semanas de edad fueron implantados con  $10^4$  células de la línea celular de cáncer de mama 4T1 en la glándula mamaria derecha. En el día 5 post-implante se inmunizaron vía subcutánea con 100  $\mu$ g de cada tratamiento y en el caso del control de implante con PBS. Al día 30 post-implante, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones. Las macrometástasis se contaron en la superficie del pulmón. En el grupo control de implante  $n=9$ , en Ab2+  $n=7$ , en Ab1+  $n=4$  y en Ab control negativo  $n=8$ .

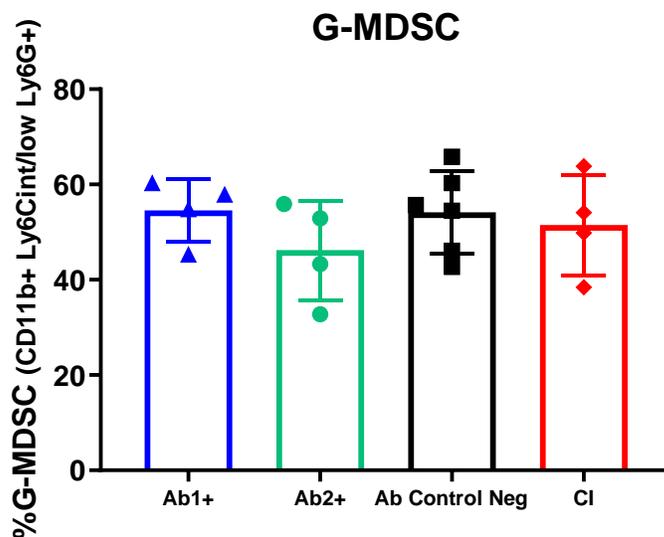
#### 6.4 Inmunofenotipificación de células infiltrantes de bazo y tumor

Las células de bazo se obtuvieron y tiñeron con anticuerpos de superficie para caracterizar las poblaciones presentes en dicho tejido al día 30 post-implante. Se realizó la inmunofenotipificación de las poblaciones de linfocitos T y células supresoras derivadas de la línea mieloide de tipo granulocítico. En la figura 11 se muestran los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en bazo, se puede observar que el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es ligeramente mayor en el grupo tratado con Ab2+ respecto con los grupos controles. Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> es significativamente mayor en el grupo tratado con Ab1+ con respecto al grupo de anticuerpo control negativo, mientras los grupos Ab2+ y control de implante mostraron porcentajes similares entre sí.



**Fig. 11** Porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de bazo. 250 000 células de bazo fueron obtenidas al día 30 post-implante y teñidas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. En todos los grupos n=4.

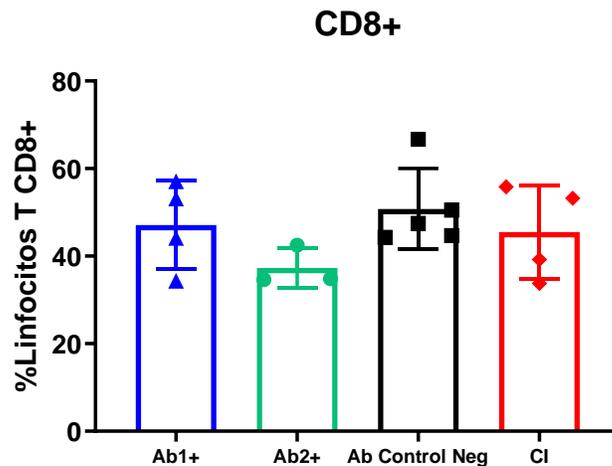
Los porcentajes de células supresoras derivadas de la línea mieloide se muestran en la figura 12. Se puede observar que los porcentajes son muy similares entre grupos, a excepción del grupo tratado con Ab2+, en el cual se observa una ligera disminución con respecto a los grupos control, aunque no es estadísticamente significativa.



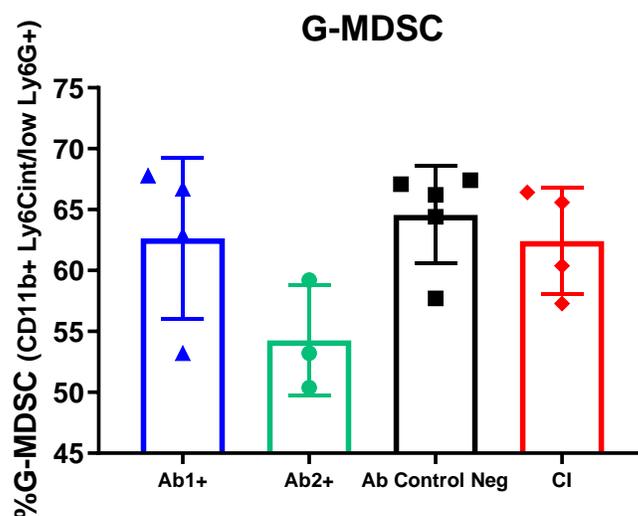
**Fig. 12** Porcentajes de células supresoras derivadas mieloides de tipo granulocítico infiltrantes de bazo. Las células de bazo se obtuvieron al día 30 post-implante y 250 000 células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD11b, anti-MHC-II, anti-Ly6G y anti-Ly6C. En los grupos Ab1+, Ab2+ y control de implante n=4 y en Ab control negativo n=5.

Por otro lado, en tumor se evaluaron los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células supresoras mieloides. El porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se ve ligeramente disminuido en

el grupo tratado con Ab2+ sin embargo este cambio no es estadísticamente significativo (Fig. 13). El porcentaje de células supresoras derivadas de la línea mieloides también se encuentra disminuido en el grupo con tratamiento con Ab2+ sin diferencia estadísticamente significativa (Fig. 14).



**Fig. 13** Porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup> de tumor. 750 000 células de bazo fueron obtenidas al día 30 post-implante y teñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8. En los grupos Ab1+ y control de implante n=4, en Ab2+ n=3 y en Ab control negativo n=5.



**Fig. 14** Porcentajes de células supresoras derivadas mieloides de tipo granulocítico infiltrantes de tumor. Las células de tumor se obtuvieron al día 30 post-implante y 750 000 células de tumor fueron teñidas con anticuerpos anti-CD11b, anti-MHC-II, anti-Ly6G y anti-Ly6C. En los grupos Ab1+ y control de implante n=4, en Ab2+ n=3 y en Ab control negativo n=5.

## 7 Discusión

La inmunoterapia ha surgido como una alternativa de tratamiento contra el cáncer que busca ser más específico y efectivo que las terapias convencionales. Se han probado en combinación con las terapias convencionales como la quimioterapia y radiación mejorando en algunos casos la supervivencia de los pacientes (Liu & Guo, 2018). Entre las opciones de tratamiento que ofrece la inmunoterapia existen algunas de ellas que emplean anticuerpos. La mayoría de las terapias contra el cáncer que emplean anticuerpos van dirigidas contra los *checkpoints* inmunológicos como CTLA-4, PD-1 o PD-L1 con el objetivo de impedir que cumplan su función supresora a las respuestas celulares dirigidas contra los antígenos tumorales o en inmunoterapias pasivas se administran anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos asociados a tumor (TAA) (Tan, et al., 2020; Sahu & Suryawanshi, 2021).

Se ha observado que la participación de los anticuerpos monoclonales anti- antígenos asociados a tumor no se limita sólo a bloquear los antígenos hacia los cuales están dirigidos, sino que son capaces de eliminar células tumorales mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) y en modelos animales incluso se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-TAAs pueden inducir respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Wittrup, 2017). Los mecanismos mediante los cuales las terapias con anticuerpos monoclonales anti-TAAs inducen respuestas de células T son mediante efecto vacunal, en el cual mediante la eliminación de células tumorales se liberan antígenos tumorales que pueden ser captados por APCs y presentados a linfocitos T CD8<sup>+</sup>. El otro mecanismo por el cual se inducen las respuestas celulares es mediante la modificación del microambiente tumoral mediante la producción de citocinas proinflamatorias derivadas de células de la respuesta innata activadas por la ADCC (Wittrup, 2017)

Sin embargo, existe un tipo de inmunoterapia que emplea anticuerpos anti-idiotipo que buscan activar respuestas contra antígenos del tumor sin utilizar directamente el antígeno original a partir de los mimótopos de los antígenos tumorales contenidos en los CDRs de dichos anticuerpos. En el presente estudio se evaluó el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo de anticuerpos anti-4T1 policlonales, es decir anticuerpos hacia cualquier antígeno tumoral presente en las células 4T1, en un modelo murino de cáncer de mama.

De acuerdo con lo observado en el área tumoral y el número de metástasis, el tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo (Ab2+) no tuvo efecto anti-tumoral en este modelo de cáncer, ya que en los grupos con tratamiento se observó mayor área tumoral que en los grupos

control. Una posible causa por la cual no se observó el efecto esperado podría deberse al método utilizado para la purificación de los anticuerpos. En el presente trabajo se empleó proteína G, la cual tiene la ventaja de unirse a todas las subclases de IgG, a diferencia de otras proteínas como la proteína A que tiene muy baja o nula afinidad por la IgG1 de ratón (Kanje, et al., 2020). Sin embargo, la purificación con dicha proteína permite obtener IgG total del suero, por lo que no fue posible obtener únicamente a los anticuerpos específicos de interés, en ninguna de las dos purificaciones.

Con el fin de mejorar la obtención de los anticuerpos para estudios posteriores, sería recomendable utilizar un método de purificación que permita separar únicamente a los anticuerpos específicos contra las células 4T1 (Ab1), lo que a su vez permitiría generar anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) específicos y así se evitaría el efecto de dilución tanto en la producción como en el tratamiento. Una alternativa podría ser obtener proteínas de las células 4T1 mediante un lisado celular, posteriormente acoplar las proteínas del lisado a una matriz como la agarosa, y realizar una purificación por cromatografía de afinidad para obtener sólo los Ab1 específicos hacia antígenos de las células 4T1. Adicionalmente, sería conveniente realizar un western blot o ELISA, previo a la purificación para confirmar la presencia de Ab1 en el suero y después de la purificación para comprobar la especificidad de los mismos.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el método más usado para generar anticuerpos anti-idiotipo es por medio de tecnología de hibridomas fusionando células de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados con los anticuerpos de interés, los cuales a su vez se obtienen del suero de conejos inmunizados con el antígeno de interés (Lan, et al., 2015).

En un estudio reciente resaltan la importancia de la utilización de anticuerpos como fuente de antígenos tumorales para desarrollar métodos de diagnóstico en estadios tempranos y para obtener nuevos y mejores blancos terapéuticos (Young, et al., 2019). Mediante la obtención de células secretoras de anticuerpos (ACS por sus siglas en inglés) derivadas de ganglios linfáticos que drenan el tumor generaron los anticuerpos y posteriormente se realizó el cribado de los antígenos con extractos proteicos de líneas celulares y microarreglos de proteínas. Según con lo reportado por los autores, éste parece ser un buen método para obtener anticuerpos específicos contra las células tumorales y se evitan las desventajas de utilizar anticuerpos de suero como la dilución con anticuerpos no específicos y la formación de inmunocomplejos (Young, et al., 2019; McDaniel, et al., 2018).

Otra razón por la cual es posible que no se haya observado efecto con el tratamiento podría deberse al tipo de anticuerpos que se genera en este modelo de cáncer. Según lo reportado en estudios previos, en dónde se analizó la respuesta de anticuerpos contra tumores de la línea 4T1 en suero de ratones, se evidenció que en este modelo murino de cáncer de mama se producen IgM e IgG hacia antígenos del tumor 4T1, aunque con diferencias en la cinética de producción (Díaz, et al., 2014). La respuesta de IgG se mantiene menos que la de IgM durante las 5 semanas de desarrollo del tumor y los autores asociaron esta disminución de la respuesta de IgG con la inmunosupresión generada en este modelo, lo cual también coincide con la inmunosupresión de este tipo de respuesta observada en mujeres y modelos animales (Díaz, et al., 2014). De acuerdo con lo anterior, es posible que la respuesta de IgG no sea la que predomine; además ya que se purificaron anticuerpos IgG policlonales totales, la concentración de los anticuerpos anti-idiotipo de interés pudo estar diluida con otros anticuerpos y la dosis administrada no fue suficiente para generar la respuesta deseada.

Previamente se ha observado que el tratamiento con IgG vía intravenosa en pacientes con cáncer y una enfermedad autoinmune provoca la reducción del tumor. Por lo tanto, Xu y colaboradores probaron la administración intravenosa de IgG no específica en bajas dosis y observaron efectos terapéuticos y profilácticos en diferentes modelos de cáncer murino (Xu, et al., 2019). Este resultado contrasta con lo observado en el grupo Ab1+, en dónde la administración de IgG total del suero de ratones con tumor provocó que el área tumoral fuera mayor incluso que en los grupos control. Sin embargo, las dosis y la vía de administración fueron distintas, lo que podría sugerir que probar otras dosis y otra vía de administración como la intravenosa tendrían mejor efecto. Se han reportado estudios con otro tipo de vacunas o tratamientos administrados *in situ* del tumor con efectos favorables en la eliminación de tumores locales y de metástasis distantes, por lo que podría ser otra vía de administración a evaluarse con los tratamientos con anticuerpos anti-idiotipo (Sagiv-Barfi, et al., 2018).

Por otro lado, se ha comparado la utilización de las inmunoglobulinas completas o de los fragmentos de unión al antígeno (Fab, por sus siglas en inglés) en su eficacia terapéutica. Se ha observado en estudios sobre autoinmunidad que al fusionar proteínas al fragmento cristizable (Fc) de una IgG se genera tolerancia en respuestas de linfocitos T y B hacia dicha proteína (Blumberg, et al. 2018; De Groot, et al., 2008). Así mismo se ha observado que las IgG monoméricas inducen tolerancia, mientras que cuando las IgG están agregadas

o formando inmunocomplejos son inmunogénicas (Blumberg, et al. 2018; St. Clair et al., 2017). Se sugiere que el mecanismo mediante el cual se induce la inmunosupresión principalmente es mediante la generación de respuestas de linfocitos T reguladores, los cuales mediante la producción de citocinas supresoras como IL-10, inhiben las respuestas efectoras (Hsieh, et al., 2021). En el presente estudio no se evaluaron los porcentajes de linfocitos T reguladores pero el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales ligeramente elevado en el grupo tratado con Ab1 podría estar asociado con el área tumoral observada en este grupo, ya que se podría sugerir que se trata principalmente de linfocitos T reguladores.

Una alternativa para evitar generar tolerancia e inmunosupresión con la administración de anticuerpos sería retirar las fracciones Fc y conservar sólo las regiones Fab. Un método comúnmente usado para este objetivo es la digestión a pH ácido con alguna proteasa como pepsina o ficina, seguido de una purificación por cromatografía de afinidad para obtener sólo los fragmentos Fab (Jones & Landon, 2002; Kinman & Pompano, 2019). No obstante, Durrant y colaboradores observaron que el tratamiento con un anticuerpo anti-idiotipo humano de tipo IgG1 estimula respuesta de linfocitos T cooperadores y citotóxicos mientras que al retirar la región Fc la respuesta de Ts fue 1000 veces menor (Durrant, et al., 2001). En contraste, en otro estudio compararon la capacidad de generar una respuesta de linfocitos T, al inmunizar ratones con construcciones de anticuerpos intactos expresando epítomos de T en los CDRs o bien sólo con los CDRs modificados y observaron que al inmunizar con los CDRs se generaban mejores respuestas de Ts (Metheringham, et al., 2009).

El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales ligeramente elevado en el grupo tratado con Ab1 coincide con lo reportado por Huang y colaboradores con respecto a las variaciones en la proporción de linfocitos T CD8 y CD4 dependiendo el estadio del cáncer y el órgano que se evalúa. En dicho trabajo observaron que el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> era mayor en las etapas tempranas de desarrollo del tumor, mientras que los CD4<sup>+</sup> incrementaban en los estadios tardíos (Huang, et al., 2015). Así mismo, evaluaron qué subclase de CD4 predominaba en cada etapa y se dieron cuenta que en etapas tempranas de desarrollo del tumor predomina los CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, mientras que en las etapas tardías esta subclase disminuye y se incrementan los CD4<sup>+</sup> T reguladores, aunque desde las primeras etapas esta última población se encuentra en porcentajes mayores a otras subpoblaciones, lo que indica que la población de T reguladores siempre está presente y en mayor proporción (Huang, et al., 2015).

El modelo de cáncer 4T1 se caracteriza por generar inmunosupresión en bazo y tumor provocado principalmente por el elevado porcentaje de células supresoras derivadas mieloides (MDSC). Este es un tipo de células que proliferan en cáncer, inflamación y algunas infecciones que se caracterizan por suprimir las respuestas de linfocitos T y por tanto representan pronósticos poco favorables en cáncer (Gabrilovich & Nagaraj, 2009; Veglia, et al., 2021). Los mecanismos mediante los cuáles inducen la inmunosupresión son producción de citocinas inhibitorias, agotamiento de arginina, secreción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y promoción de la proliferación de linfocitos T reguladores (Markowitz, et al., 2013). Son reclutadas al tumor gracias a la alta producción de quimiocinas en el microambiente tumoral y promueven la metástasis en algunos tumores, ya que se cree que las MDSCs circulantes pueden ser atraídas por quimiocinas secretadas por tejidos pre-metastásicos (Markowitz, et al., 2013). El crecimiento tumoral observado en el grupo tratado con Ab2+ fue menor que el grupo tratado con Ab1+ y podría estar relacionado con la proporción de este tipo de células infiltradas en el tumor, ya que se observó un porcentaje menor en el grupo Ab2+.

Finalmente, es importante resaltar que la participación de los linfocitos B y los anticuerpos en la respuesta antitumoral aún no está bien definida, ya que dependiendo del tipo de cáncer su función puede ser antitumoral o pro-tumoral (Yuen, et al. 2016). En modelos murinos de carcinoma de células escamosas se ha observado la formación de complejos inmunes que pueden depositarse en tejido premaligno y activar receptores Fc de macrófagos, así como activar al complemento y generar un ambiente proangiogénico y de remodelación de tejido que activa la hiperproliferación de los queratinocitos (Friedman, et al., 2021).

En humanos, se ha observado que la presencia de IgG anti-MUC1 en cáncer gástrico y de mama se asocia con un pronóstico favorable, mientras que en cáncer renal y de pulmón la presencia de IgG circulante provoca activación de complemento y formación de inmunocomplejos que se acumulan (Friedman, et al., 2021). La presencia de células B reguladoras provenientes del tumor puede inducir la conversión de linfocitos T CD4+ en reposo a linfocitos T reg a partir de la secreción de TGF- $\beta$  y el número elevado en células T reg induce metástasis en pulmón (Olkhanud, et al., 2011).

En nuestro caso, lo observado en el tamaño tumoral en los grupos tratados podría sugerir que la presencia de anticuerpos anti-tumor no son favorables para el pronóstico en este modelo, lo cual coincide con lo ya mencionado en otros modelos animales. Además, se ha

planteado que los anticuerpos también pueden predecir si el paciente tendrá buena respuesta al tratamiento con inmunoterapia (Qiu, et al., 2018)

Se ha reportado que las respuestas de células B se generan en etapas tempranas del desarrollo del tumor, por lo que la utilización de anticuerpos como herramienta de diagnóstico también ha sido explorada. Así mismo, la identificación de antígenos antes de que el tumor sea palpable permite seleccionar antígenos que aún no han escapado de la inmunovigilancia (Stanton, et al., 2021). En base a esta observación, Stanton y colaboradores identificaron una serie de antígenos en etapas tempranas del desarrollo tumoral en dos modelos murinos, que fueron capaces de inhibir el crecimiento de líneas tumorales humanas y el crecimiento de tumor al ser administrados en ratones (Stanton, et al., 2021).

## **8 Conclusión**

Se generaron anticuerpos anti-idiotipo a partir de anticuerpos anti-4T1; sin embargo, el tratamiento con anticuerpos idiotipo y anti-idiotipo no tuvo un efecto terapéutico antitumoral en el modelo de cáncer de mama 4T1 al ser administrado en una sola dosis por vía subcutánea, ya que no se observó disminución en el tamaño tumoral ni el número de metástasis en pulmón.

## **9 Perspectivas**

Para mejorar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se podrían realizar los siguientes cambios en futuros experimentos:

Para la generación y purificación de los anticuerpos sería conveniente probar un método que permita obtener únicamente los anticuerpos de interés y así evitar el efecto de dilución con otros anticuerpos del suero para las inmunizaciones y tratamientos. Así mismo, sería interesante comparar el efecto de retirar la porción Fc de las inmunoglobulinas, en la generación de respuesta de linfocitos T con el tratamiento.

Por otro lado, sería bueno probar una vía de administración distinta de los anticuerpos anti-idiotipo y agregar dosis de refuerzo al tratamiento para ver si esto permite generar un efecto antitumoral.

Finalmente, también sería interesante comprobar si los anticuerpos contra las células cancerosas (Ab1) en realidad estimulan el crecimiento tumoral y de ser así, conocer mediante que mecanismo lo hacen.

## 10 Referencias

- Alfonso, S., Valdés-Zayas, A., Santiesteban, E. R., Flores, Y. I., Areces, F., Hernández, M., Viada, C. E., Mendoza, I. C., Guerra, P. P., García, E., Ortiz, R. A., de la Torre, A. V., Cepeda, M., Pérez, K., Chong, E., Hernández, A. M., Toledo, D., González, Z., Mazorra, Z., Crombet, T., ... Macías, A. E. (2014). A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(14), 3660–3671. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1674>
- Almagro, J. C., Daniels-Wells, T. R., Perez-Tapia, S. M., & Penichet, M. L. (2018). Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Frontiers in immunology*, 8, 1751.
- Bardos, A.P. (2005). Treatment of ovarian cancer. Nueva York, EU: Nova Science Publishers.
- Bhattacharya-Chatterjee, M., Mukerjee, S., Biddle, W., Foon, K. A., & Köhler, H. (1990). Murine monoclonal anti-idiotypic antibody as a potential network antigen for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol*, 145, 2758–2765.
- Bhattacharya-Chatterjee, M., Nath, R., Chatterjee, S., Das, R., Zeytin, H. Chakraborty, M. & Foon, K. (2000). Counterpoint. Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotypic vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol Immunother*, 49, 133-141.
- Biragyn, A., Tani, K., Grimm, M.C., Weeks, S., & Kwak, L.W. (1999). Genetic fusion of chemokines to a self-tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat.Biotechnol.* 17, 253–258.
- Blumberg, R. S., Lillicrap, D., & IgG Fc Immune Tolerance Group (2018). Tolerogenic properties of the Fc portion of IgG and its relevance to the treatment and management of hemophilia. *Blood*, 131(20), 2205–2214. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-822908>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin*, 68:394–424394.
- Buhrman, J. D., & Slansky, J. E. (2013). Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines. *Immunologic research*, 55(1-3), 34–47.
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of personalized medicine*, 11(8), 808. <https://doi.org/10.3390/jpm11080808F>
- Civetta, María Teresa Martín de & Civetta, Julio Domingo. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53, 405-414.
- Davda, J., Declerck, P., Hu-Lieskovan, S., Hickling, T. P., Jacobs, I. A., Chou, J., Salek-Ardakani, S., & Kraynov, E. (2019). Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 105.
- Díaz-Zaragoza, M., Hernández, R., & Ostoa-Saloma, P. (2014). 2D immunoblots show differential response of mouse IgG and IgM antibodies to antigens of mammary

carcinoma 4 T1 cells. *Cancer cell international*, 14(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-9>

- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991–998.
- Durrant, L. G., Parsons, T., Moss, R., Spendlove, I., Carter, G., & Carr, F. (2001). Human anti-idiotypic antibodies can be good immunogens as they target FC receptors on antigen-presenting cells allowing efficient stimulation of both helper and cytotoxic T-cell responses. *International journal of cancer*, 92(3), 414–420. <https://doi.org/10.1002/ijc.1194>
- Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The journal of breast health*, 11(2), 59–66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
- Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N., Del Rincon, S. V., Papneja, N., & Miller, W. H., Jr (2020). A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 27(Suppl 2), S87–S97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, 23, 620–633.
- Foon KA, Bhattacharya-Chatterjee M. (2001). Are solid tumor anti-idiotypic vaccines ready for prime time? Commentary re: U. Wagner et al., Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment. *Clin. Cancer Res*, 7: 1154–1162, 2001. *Clin Cancer Res*, 7,1112–1115.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, 7(5), 1016–1036.
- Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J. H., & Sørli, T. (2020). Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nature communications*, 11(1), 1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15574-5>
- Fridman, W. H., Petitprez, F., Meylan, M., Chen, T. W., Sun, C. M., Roumenina, L. T., & Sautès-Fridman, C. (2021). B cells and cancer: To B or not to B?. *The Journal of experimental medicine*, 218(1), e20200851. <https://doi.org/10.1084/jem.20200851>
- Gabrilovich, D., Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174 (2009). <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Gajdosik Z. (2014). Racotumomab - a novel anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine for the treatment of cancer. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*, 50(4), 301–307. <https://doi.org/10.1358/dot.2014.50.4.2116670>
- Gonzalez, H., Hagerling, C., & Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*, 32, 1267–1284.
- Guan X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharma Sin B*, 5, 402–418.

- Guthmann, M. D., Castro, M. A., Cinat, G., Venier, C., Koliren, L., Bitton, R. J., Vázquez, A. M., & Fainboim, L. (2006). Cellular and humoral immune response to N-Glycolyl-GM3 elicited by prolonged immunotherapy with an anti-idiotypic vaccine in high-risk and metastatic breast cancer patients. *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997), 29(2), 215–223. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000188502.11348.34>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J., & DuBridge, R. B. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs*, 2(3), 256–265.
- Henriques, B., Mendes, F., & Martins, D. (2021). Immunotherapy in Breast Cancer: When, How, and What Challenges?. *Biomedicines*, 9(11), 1687. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111687>
- Hernández, A. M., Rodríguez, M., López-Requena, A., Beausoleil, I., Pérez, R., & Vázquez, A. M. (2005). Generation of anti-Neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: A self-versus non-self-matter. *Immunobiology*, 210(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.02.002>
- Hsieh, L. E., Sidney, J., Burns, J. C., Boyle, D. L., Firestein, G. S., Altman, Y., Sette, A., & Franco, A. (2021). IgG Epitopes Processed and Presented by IgG+ B Cells Induce Suppression by Human Thymic-Derived Regulatory T Cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 206(6), 1194–1203. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001009>
- Hon, J. D., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V. Y., Deng, F. M., Zhang, D. Y., Monaco, M. E., & Lee, P. (2016). Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res*, 6, 1864–1872.
- Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M. A., Hoft, D. F., Hsueh, E. C., & Peng, G. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, 6(19), 17462–17478. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3958>
- Inthagard, J., Edwards, J., & Roseweir, A. K. (2019). Immunotherapy: enhancing the efficacy of this promising therapeutic in multiple cancers. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(2), 181–193. <https://doi.org/10.1042/CS20181003wi>
- Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, 9, 205–218.
- Jones, R. G., & Landon, J. (2002). Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')(2) fragments in high yield from serum. *Journal of immunological methods*, 263(1-2), 57–74. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00031-5)
- Jordan, K. R., McMahan, R. H., Kemmler, C. B., Kappler, J. W., & Slansky, J. E. (2010). Peptide vaccines prevent tumor growth by activating T cells that respond to

native tumor antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4652–4657.

- Kanje, S., Scheffel, J., Nilvebrant, J., & Hober, S. (2020). Engineering of Protein A for improved purification of antibodies and Fc-fused proteins. *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, 35–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00002-3>
- Kieber-Emmons, T., Monzavi-Karbassi, B., Pashov, A., Saha, S., Murali, R., & Kohler, H. (2012). The promise of the anti-idiotypic concept. *Front Oncol*, 2, 196.
- Kinman, A., & Pompano, R. R. (2019). Optimization of Enzymatic Antibody Fragmentation for Yield, Efficiency, and Binding Affinity. *Bioconjugate chemistry*, 30(3), 800–807. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00912>
- Kohler, H., Pashov, A. & Kieber-Emmons, T. (2019). The Promise of Anti-idiotypic Revisited. *Front. Immunol*, 10, 1-7.
- Ladjemi M. Z. (2012). Anti-idiotypic antibodies as cancer vaccines: achievements and future improvements. *Front Oncol*, 2, 158.
- Lan, H. N., Jiang, H. L., Li, W., Wu, T. C., Hong, P., Li, Y. M., Zhang, H., Cui, H. Z., & Zheng, X. (2015). Development and Characterization of a Novel Anti-idiotypic Monoclonal Antibody to Growth Hormone, Which Can Mimic Physiological Functions of Growth Hormone in Primary Porcine Hepatocytes. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(4), 573–583. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0600>
- Liang, S., & Zhang, C. (2020). Prediction of immunogenicity for humanized and full human therapeutic antibodies. *PloS one*, 15(8), e0238150.
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends Biochem Sci*, 41, 211–218.
- Linthicum, D. S. & Farid, N. R. (1988). *Anti-Idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry*. Nueva York, EU: Springer Science & Business Media.
- Liu, M., & Guo, F. (2018). Recent updates on cancer immunotherapy. *Precision clinical medicine*, 1(2), 65–74. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pby011>
- López, A., Zabalegui, N., Rodríguez, M., Bnedogés, S. & Bendandi, M. (2007). Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment. *Oncogene*, 26, 3594–3602.
- López-Requena, A., Burrone, O. R., & Cesco-Gaspere, M. (2012). Idiotypes as immunogens: facing the challenge of inducing strong therapeutic immune responses against the variable region of immunoglobulins. *Front Oncol*, 2, 159.
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Mäkitie, AA, Almangush, A, Rodrigo, JP, Ferlito, A, Leivo, I. (2019). Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. *Head & Neck*, 41, 3712– 3718.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L. I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodriguez, M., & Govezensky, T. (1999). Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective

- vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infection and immunity*, 67(9), 4764–4770. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4764-4770.1999>
- McDaniel, J.R., Pero, S.C., Voss, W.N. et al. Identification of tumor-reactive B cells and systemic IgG in breast cancer based on clonal frequency in the sentinel lymph node. *Cancer Immunol Immunother* 67, 729–738 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2123-2>
  - Metheringham, R. L., Pudney, V. A., Gunn, B., Towey, M., Spendlove, I., & Durrant, L. G. (2009). Antibodies designed as effective cancer vaccines. *mAbs*, 1(1), 71–85. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.1.7492>
  - Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET clinics*, 13(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
  - Mohanty, K., Saha, A., Pal, S., Mallick, P., Chatterjee, S. K., Foon, K. A., & Bhattacharya-Chatterjee, M. (2007). Anti-tumor immunity induced by an anti-idiotypic antibody mimicking human Her-2/neu. *Breast cancer research and treatment*, 104(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9391-9>
  - Murphy, K. & Weaver, C. (2017). *Janeway's Immunobiology*. New York, US: Garland Science, Taylor & Francis Group.
  - Murphy, C., Devine, T & O'Kennedy, R. (2016). Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technology Journal*, 6, 17–32. <https://doi.org/10.2147/ANTI.S64762>
  - National Cancer Institute. (2015) What is cancer?. United states. NIH National Cancer Institute. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
  - National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); (2007). *Understanding Cancer*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
  - Odales, J., Guzman Valle, J., Martínez-Cortés, F., & Manoutcharian, K. (2020). Immunogenic properties of immunoglobulin superfamily members within complex biological networks. *Cellular immunology*, 358, 104235.
  - Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P., & Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*, 71(10), 3505–3515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4316>
  - Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
  - Pfaunmiller, E. L., Anguizola, J. A., Milanuk, M. L., Carter, N., & Hage, D. S. (2016). Use of protein G microcolumns in chromatographic immunoassays: A comparison of competitive binding formats. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies*

- in the biomedical and life sciences, 1021, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.055>
- Qiu, J., Keyser, B., Lin, Z. T., & Wu, T. (2018). Autoantibodies as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Biosensors*, 8(3), 67. <https://doi.org/10.3390/bios8030067>
  - Ramos-de-la-Peña, A. M., González-Valdez, J., & Aguilar, O. (2019). Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of separation science*, 42(9), 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>
  - Sagiv-Barfi, I., Czerwinski, D. K., Levy, S., Alam, I. S., Mayer, A. T., Gambhir, S. S., & Levy, R. (2018). Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy. *Science translational medicine*, 10(426), eaan4488. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4488>
  - Sahu, M., & Suryawanshi, H. (2021). Immunotherapy: The future of cancer treatment. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 25(2), 371. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.325257>
  - Sambhi, M., Bagheri, L., & Szewczuk, M. R. (2019). Current Challenges in Cancer Immunotherapy: Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates. *Journal of oncology*, 2019, 4508794. <https://doi.org/10.1155/2019/4508794>
  - Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, 173, 321-337.
  - Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565–1570.
  - Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., Bukur, T., Bukur, V., Holtsträter, C., Ritzel, C., Manninen, K., Tadmor, A. D., Vormehr, M., Sahin, U., & Löwer, M. (2020). Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in oncology*, 10, 1195. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>
  - Slansky, J. E., & Nakayama, M. (2020). Peptide mimotopes alter T cell function in cancer and autoimmunity. *Seminars in immunology*, 47, 101395.
  - St Clair JB, Detanico T, Aviszus K, Kirchenbaum GA, Christie M, Carpenter JF, Wysocki LJ. Immunogenicity of Isogenic IgG in Aggregates and Immune Complexes. *PLoS One*. 2017 Jan 23;12(1):e0170556. doi: 10.1371/journal.pone.0170556. PMID: 28114383; PMCID: PMC5256993.
  - Stanton, S.E., Gad, E., Ramos, E. et al. Tumor-associated autoantibodies from mouse breast cancer models are found in serum of breast cancer patients. *Breast Cancer* 7, 50 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00257-1>
  - Stills H. F., Jr (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal*, 46(3), 280–293.
  - Talotta, R., Rucci, F., Canti, G., & Scaglione, F. (2019). Pros and cons of the immunogenicity of monoclonal antibodies in cancer treatment: a lesson from autoimmune diseases. *Immunotherapy*, 11(3), 241–254.

- Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother.* 2020 Apr;124:109821. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109821. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31962285.
- Vani, J., Nayak, R., & Shaila, M. S. (2007). A CD8+ T cell clone specific for antigen also recognizes peptidomimics present in anti-idiotypic antibody: implications for T cell memory. *Cell immunol*, 246, 17–25.
- Vázquez, A. M., Pérez, A., Hernández, A. M., Macías, A., Alfonso, M., Bombino, G., & Pérez, R. (1998). Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*, 17(6), 527–534. <https://doi.org/10.1089/hyb.1998.17.527>
- Vázquez, A. M., Hernández, A. M., Macías, A., Montero, E., Gómez, D. E., Alonso, D. F., Gabri, M. R., & Gómez, R. E. (2012). Racotumomab: an anti-idiotypic vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides - preclinical and clinical data. *Front Oncol*, 2, 150.
- Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* 21, 485–498 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>
- Wang, L., Sun, X., & Ghosh, R. (2008). Purification of equine IgG using membrane based enhanced hybrid bioseparation technique: a potential method for manufacturing hyperimmune antibody. *Biotechnology and bioengineering*, 99(3), 625–633. <https://doi.org/10.1002/bit.21614>
- Watkins, E. (2019). Overview of breast cancer, *JAAPA*, 32(10), 13-17.
- Wenbin, K., Xiaoqin, L., Qiuchan, D., Xinwen, Z., Xiaoqin, X., Fangyuan, S., Dabao, H., & Shuangjiu, Z. (2020). Development of a novel insulin receptor (IR) antagonist that exhibits anti-breast tumor activity. *Human cell*, 33(4), 1204–1217. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00381-3>
- Wittrup K. D. (2017). Antitumor Antibodies Can Drive Therapeutic T Cell Responses. *Trends in cancer*, 3(9), 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.07.001>
- Xu, Q., Zhang, Z., Chen, Z., Zhang, B., Zhao, C., Zhang, Y., Zhao, C., Deng, X., Zhou, Y., Wu, Y., & Gu, J. (2019). Nonspecific immunoglobulin G is effective in preventing and treating cancer in mice. *Cancer management and research*, 11, 2073–2085. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S188172>
- Yuen, G. J., Demissie, E., & Pillai, S. (2016). B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends in cancer*, 2(12), 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.010>
- Young, A. R., Duarte, J., Coulson, R., O'Brien, M., Deb, S., Lopata, A., Behren, A., Mathivanan, S., Lim, E., & Meeusen, E. (2019). Immunoprofiling of Breast Cancer Antigens Using Antibodies Derived from Local Lymph Nodes. *Cancers*, 11(5), 682. <https://doi.org/10.3390/cancers11050682>
- Zhang, Y., Lin, Z., Wan, Y., Cai, H., Deng, L., & Li, R. (2019). The Immunogenicity and Anti-tumor Efficacy of a Rationally Designed Neoantigen Vaccine for B16F10 Mouse Melanoma. *Frontiers in immunology*, 10, 2472.