



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA BIBLIOTECA
MULTIEPITÓPICA DERIVADA DE LA PROTEÍNA OFA/ILRP EN UN MODELO
MURINO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA

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

PRESENTA:
FERNANDO MARTÍNEZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS
DR. KAREN MANUCHARYAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DRA. BLANCA MARGARITA BAZÁN PERKINS
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras
sino por los obstáculos que superas ”

Ethan Hawke

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo doctoral se realizó gracias al financiamiento proporcionado por el (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM), No. IN205216 y IN212323) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), No. N283036). Además, de la beca que se me fue otorgada por CONACYT (CVU/Becario: 694686 / 582552). Aunado a este financiamiento agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Dr. Karen Manucharyan Airapetian, por permitirme estar en su grupo de investigación y por su invaluable guía durante mi desarrollo profesional y de compartir ese humor que lo caracteriza.

A la Dra. Romina Ma. De la Paz Rodríguez Sanoja y a la Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins por sus consejos, observaciones y guía en el desarrollo del proyecto.

A los integrantes del jurado, la Dra. Adela Rodríguez Romero, la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano y el Dr. Baltazar Becerril Luján por el tiempo invertido para revisar y mejorar con sus comentarios esta tesis.

A la M. en B. María Elena Munguía Zamudio por su asistencia técnica y su enseñanza.

A mis compañeros de laboratorio RODOLFO, ALLAN, JESÚS, JOSUÉ Y ERÉNDIRA, por hacerme parte de sus experiencias, alegrías y locuras.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los 2 pilares de mi vida
A mis Padres:

Porque gracias a su inagotable amor, apoyo y consejos, he llegado a realizar una de mis grandes metas y ser mi inspiración de lucha y resiliencia.

A mis hermanas:

Por ser parte de mi vida y por enseñarme, que a pesar de las cosas buenas y malas, la familia y ustedes ahí estarán.

INDICE

Resumen.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Cáncer en México y en el mundo.....	2
1.2 Cáncer de mama.....	5
1.3 Generalidades del cáncer.....	7
1.4 Respuesta inmunitaria y Cáncer.....	10
1.5 Terapias convencionales contra el cáncer	15
1.6 Inmunoterapias contra el cáncer	16
1.7 Obstáculos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.....	21
2. ANTECEDENTES.....	22
2.1 Antígeno oncofetal, proteína del receptor de laminina inmadura (OFA/iLRP)	22
2.2 Vacunas de péptidos alternativos o mimótopos.....	24
2.3 Biblioteca de epítomos variables	24
2.4 Despliegue en bacteriófago	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVO GENERAL	30
6. OBJETIVOS PARTICULARES	30
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
7.1 Construcción de los inmunógenos	31
7.2 Titulación de bacteriófago filamentoso	34
7.3 Rescate y purificación de bacteriófago filamentoso	35
7.4 Material biológico.....	35
7.5 Línea celular 4T1	35
7.6 Tratamiento terapéutico con los inmunógenos BEV y WT	36
7.7 Ensayo de proliferación celular y citometría de flujo	36
7.8 Inmunofenotipificación por citometría de flujo en tratamientos terapéuticos	38
7.9 Análisis estadístico.....	38
8. RESULTADOS	40
8.1 Construcción de los inmunógenos	40

8.2 Efecto antitumoral en los ratones vacunados con las BEV	42
8.3 Respuesta inmunitaria celular inducida por las BEV	46
8.4 Las BEV inducen una alta frecuencia de células T efectoras y una baja frecuencia de células inmunosupresoras.....	49
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	59
11. PERSPECTIVAS	60
12. BIBLIOGRAFÍA	61
13. SUPLEMENTOS.....	77
14. ARTÍCULO	85

Resumen

Se estima que cada año se diagnostican más de 2 millones de casos de cáncer de mama en todo el mundo y las cifras van en aumento. A pesar de esto, el avance en el desarrollo de inmunoterapias actuales como los inhibidores de los puntos de control inmunitarios (*Immune Checkpoint Inhibitors*, ICI) y las vacunas con base en neoepítomos han demostrado resultados prometedores en la regresión tumoral. Sin embargo, existen limitaciones importantes en un subgrupo de pacientes no respondedores. Es entonces de alta relevancia continuar con la investigación de nuevas estrategias que contribuyan en el tratamiento y control del tumor de mama. Hemos propuesto el uso de una nueva estrategia de vacuna denominada biblioteca de epítomos variables (BEV), que incorpora un número sin precedentes de epítomos mutados para apuntar a la variabilidad antigénica y romper la tolerancia contra los antígenos asociados a tumores. En este estudio, utilizamos una secuencia derivada de la proteína receptora de laminina inmadura/antígeno oncofetal (OFA/iLRP) para generar inmunógenos BEV de 43 y 9 aminoácidos. Las propiedades inmunogénicas y los efectos antitumorales se probaron en un modelo de tumor de cáncer de mama metastásico agresivo 4T1. Los ratones portadores de tumores 4T1 desarrollaron respuestas de células T CD8+IFN- γ + y CD4+IFN- γ + específicas del epítopo después del tratamiento. El análisis de los tumores y los pulmones demostró que las BEV podían aumentar la cantidad de linfocitos infiltrantes de tumores con diversas funciones efectoras al tiempo que reducen la cantidad de células T reguladoras y supresoras derivadas mieloides inmunosupresoras. Lo que es más importante, los inmunógenos BEV inhibieron el crecimiento tumoral y las metástasis pulmonares después de una sola dosis. Los resultados presentados aquí son consistentes con nuestros estudios previos y proporcionan evidencia de la viabilidad de los inmunógenos BEV como inmunoterapia prometedora contra el cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer en México y en el mundo

A pesar de los avances en las tecnologías, los tratamientos y en el entendimiento de la enfermedad todavía hay dificultades para tratar exitosamente a los pacientes con cáncer. Esta enfermedad continúa siendo una de las principales causas de muerte alrededor del mundo. De acuerdo con el observatorio global del cáncer (GLOBOCAN por sus siglas en inglés), en el 2019 el cáncer fue la principal o la segunda causa de muerte en personas menores de 70 años en 112 de 183 países, mientras que en otros 23 países se posicionó como la tercera o cuarta causa de muertes. Los datos estimados en 2020 muestran 19 292 789 millones de nuevos casos y 9.9 millones de muertes por cáncer en el mundo (Sung et al., 2021). Los datos para ambos sexos combinados muestran que el cáncer de pulmón y el cáncer de mama fueron los tipos de tumores malignos con mayor número de nuevos casos seguidos por el cáncer colorrectal, próstata, estómago, hígado y cérvico uterino, los demás tipos de neoplasias malignas no representaron más del 3 % de nuevos casos individuales, pero en conjunto fueron responsables del 46 % de la incidencia (Figura 1).

Número de nuevos casos en 2020, ambos sexos y todas las edades.

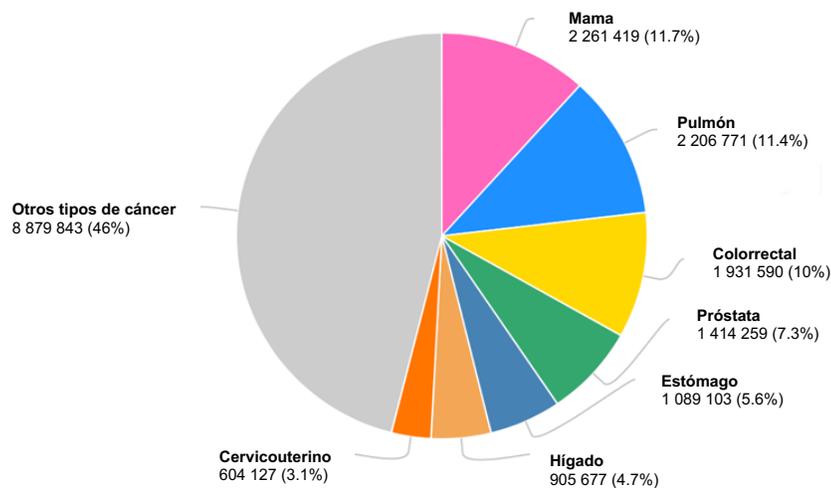
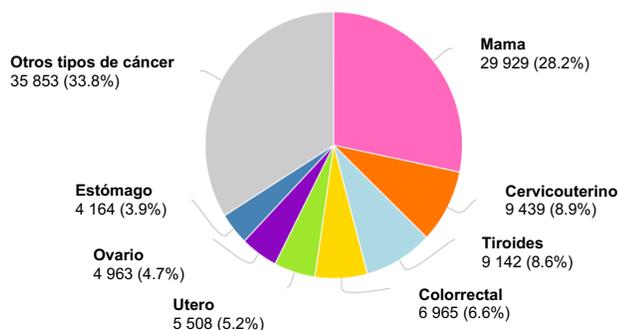


Figura 1. **Incidencia del cáncer a nivel mundial.** Números estimados de casos nuevos y porcentajes de nuevos casos en diferentes tipos de cáncer en ambos sexos y edades en todo el mundo. Adaptado de GLOBOCAN, 2021, The Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr/>.

Los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia (mama, pulmón, próstata, no melanoma, colon, estómago, hígado, recto, cérvix y esófago) representaron más del 60 % de los casos diagnosticados y más del 70 % de las muertes por cáncer (Sung et al., 2021). El cáncer de mama y el de pulmón fueron los tumores con el mayor número de nuevos casos, este último acumuló mayor número de muertes, siendo el responsable del 18 % de las muertes por neoplasias malignas, mientras que el cáncer de mama representó solamente el 6.9 %, superado por otros tipos de cánceres como el de estómago o hígado que representaron el 7.7 % y 8.3 %, respectivamente. Los datos sobre la incidencia y mortalidad causadas por los diferentes tipos de cáncer por sexo, muestran que el cáncer de pulmón es el que más comúnmente se diagnostica en hombres a nivel mundial y el que representa mayor mortalidad, seguido por el cáncer de próstata (14.1 %) y colorrectal (10.6 %) en incidencia, y el de hígado (10.4 %) y colorrectal (9.3 %) en mortalidad. Por otro lado, en las mujeres el cáncer de mama es el tumor maligno más diagnosticado y es la principal causa de muerte a nivel mundial (15.5 %), seguido por el cáncer de pulmón (13.7 %) y cáncer colorrectal (9.5 %) y en incidencia cáncer de mama (24.5 %), cáncer colorrectal (9.4 %) y cáncer de pulmón (8.4 %) (GLOBOCAN).

En la actualidad el cáncer es una enfermedad que ha sido considerada un problema de salud pública, que afecta a países de primer mundo y a países en vías de desarrollo. En México, el cáncer se posiciona como la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Mohar-Betancourt et al., 2017). Sin embargo, el cáncer de mama desde el año 2006 es la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina, se registraron 20 444 casos en mujeres con una incidencia de 35.4 casos por 100 000 mujeres (Secretaría de Salud, 2015). En el año 2015, se registró una incidencia de 27.94 casos por cada 100 000 mujeres y en el grupo de mujeres de 25 años o más se registraron 6 252 defunciones (Secretaría de Salud, 2016; INEGI 2020). En el 2019, se registró una incidencia de 35.24 por 100 000 mujeres y se registro 17.94 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años o más (INEGI, 2020). De acuerdo a las estimaciones del GLOBOCAN en el año 2020, los tipos de cáncer con mayor recurrencia en ambos sexos fueron el de mama, próstata, colorrectal, tiroides y cérvico uterino. En los hombres el cáncer con mayor mortalidad se encuentra el cáncer de próstata, pulmón, colorrectal, estómago y hígado, mientras en las mujeres el cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia y también la principal causa de muerte, seguido por cérvico uterino, hígado, colorrectal y estómago (Figura 2).

Número de nuevos casos en 2020, México, mujeres todas las edades



Número de muertes en 2020, México, mujeres todas las edades

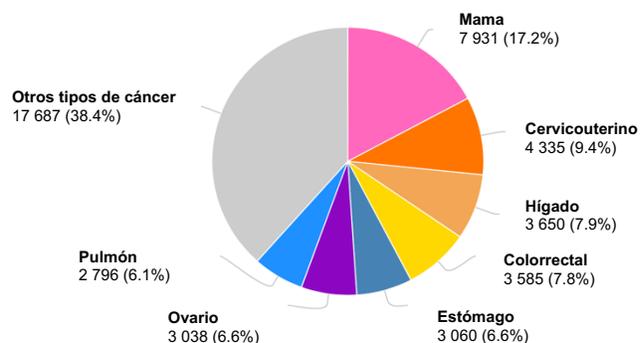


Figura 2. **Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México.** Números estimados y porcentajes de casos nuevos y muertes en diferentes tipos de cáncer en mujeres de México 2020. Adaptado de GLOBOCAN, 2021, The Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr/>.

A pesar de que en los últimos años ha existido un gran avance en el desarrollo de terapias contra el cáncer, la incidencia y mortalidad sigue en aumento en México y en el mundo. La organización mundial de la salud (OMS) prevé que la carga mundial por cáncer aumente a unos 30 millones de nuevos casos para el 2040. No obstante, se considera que es posible controlar y reducir la incidencia y mortalidad mediante la implementación de estrategias basadas en hábitos saludables y la prevención con técnica de diagnóstico temprano y el surgimiento de tratamientos más eficaces con menores efectos secundarios.

1.2 Cáncer de mama

La glándula mamaria está formada por los lóbulos, lobulillos y la grasa que los recubre, además de los vasos sanguíneos, linfático, tejido fibroso y ligamentos. Los lóbulos y lobulillos se encuentran conectados por medio de conductos que desembocan en el pezón. El cáncer de mama puede afectar dichas estructuras ya que es en estos lugares donde aparecen los tumores y de acuerdo con el origen, el cáncer de mama se puede clasificar en carcinoma ductal y lobulillar (Akram et al., 2017). El cáncer de mama suele progresar rápidamente y en estadios avanzados los tumores suelen ser invasivos. Los lóbulos y conductos consisten en un epitelio basal de células mioepiteliales y células luminales (Harbeck et al., 2019). La hiperplasia ductal atípica (HDA) es una lesión premaligna caracterizada por la presencia de células anormales dentro del lóbulo o conducto mamario. El HDA es el precursor del carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y lobulillar (CLIS) (Figura 3) (Kader et al., 2019), dicha hiperplasia es una lesión no invasiva que contiene células anormales. Con cada etapa, el riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo aumenta, una vez que las células han invadido, el riesgo de desarrollar metástasis es elevado y los nódulos linfáticos son el sitio principal de la invasión (Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

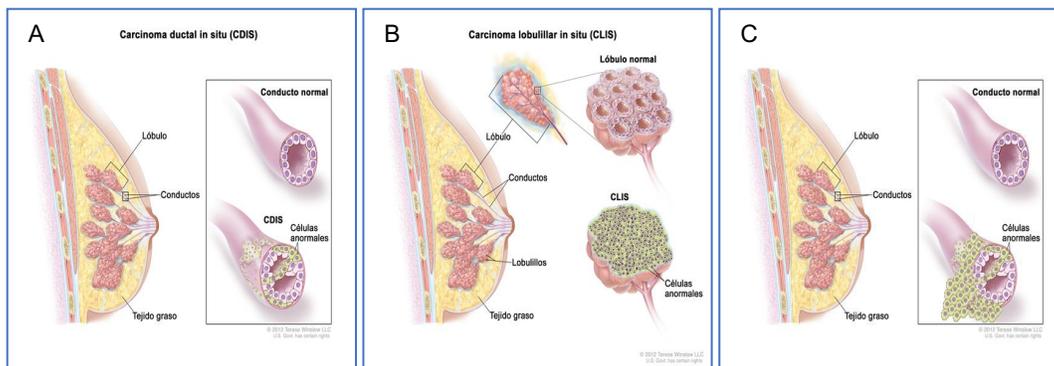


Figura 3. **Cáncer de mama.** A) Carcinoma ductal *in situ* (CDIS), hay proliferación de células anormales en el revestimiento del conducto mamario. B) Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS), hay proliferación de células anormales en los lobulillos de la mama. C) Carcinoma ductal invasivo, es el cáncer de mama más común este comienza en el revestimiento del conducto mamario, también puede suceder en los lobulillos de la mama. Adaptado de Terese Winslow LLC. (2012). *National Cancer Institute*.

En los últimos años, sobre el cáncer de mama se han desarrollado varias clasificaciones sobre la base de las características moleculares e histológicas. Por ejemplo, los subtipos histológicos son los más frecuentes del cáncer de mama. El carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar son las lesiones invasivas y sus homólogos preinvasores son el CDIS y el CLIS. Los subtipos intrínsecos de Perou y Sorlie (2000) se basan en una firma de expresión de 50 genes (PAM50) y su clasificación incluyó 4 subtipos de cáncer de mama: tipo luminal (luminal A, luminal B con expresión del receptor de estrógeno (RE)), el tipo basal, el tipo Her2 (receptor

2 del factor de crecimiento epidérmico humano) sin expresión de RE y un grupo similar a la mama normal. En la práctica clínica se usa una clasificación que se basa en la expresión histológica e inmunohistoquímica de proteínas clave: receptor de estrógeno y progesterona (RP), Her2 y el marcador de proliferación Ki67. Además de la expresión negativa de los receptores hormonales (RE-, RP-) y negativa en la expresión de Her2 (Harbeck et al., 2019). La mayoría de los cánceres de mama negativos a estos receptores son de tipo basal (50-75 %) y son generalmente menos frecuentes que los carcinomas luminales, pero son más agresivos y tienen peor pronóstico que los restantes subtipos y son nombrados cáncer de mama triple negativo (Perou, 2010; Susan, 2011).

Tabla 1. Subtipos del cáncer de mama			
Luminal A	Luminal B	HER2+	Basal
- Frecuencia 40 %	- Frecuencia 20 %	- Frecuencia 25 %	- Frecuencia 15 %
- RE+	- RE+	- RE-	- RE-
- RP+	- RP+	- RP-	- RP-
- HER2-	- HER2+/-	- HER2+	- HER2-
- Ki67 bajo	- Ki67 alto	- Ki67 alto	- Ki67 alto
- Pronóstico Favorable	- Pronóstico moderado	- Pronóstico moderado/malo	- Pronóstico malo
Perou, 2010; Susan, 2011; Harbeck et al., 2019; Orrantia-Borunda et al., 2022.			

1.3 Generalidades del cáncer

El cáncer se describe como un conjunto de enfermedades relacionadas de etiología compleja, heterogénea y dinámica (Moses et al., 2018) que se caracteriza por el crecimiento irregular de las células que se dividen sin control y pueden diseminarse a otros tejidos. El cáncer puede ser causado por factores físicos, químicos y biológicos que inducen mutaciones en el ADN de las células en los genes supresores de los tumores y los oncogenes. Esto conlleva a que una proteína pierda su actividad biológica o que gane función, una vez que estas células se dividen y crecen sin control, estas mutaciones siguen y permanecen en las células cancerosas lo que conlleva a la inestabilidad genómica. Además, estas células cancerosas siguen generando nuevas mutaciones. Sin embargo, no todas las mutaciones conducen al cáncer, sino solo aquellas que otorgan una ventaja a las células (Pon y Marra, 2015). Las neoplasias pueden ser benignas o malignas, los tumores benignos no invaden tejidos adyacentes, es decir, crecen de manera local. Los tumores malignos invaden el tejido circundante e invaden el tejido distal.

Existen más de 200 tipos de cáncer con diferentes subtipos, éstos reciben su nombre de acuerdo a las células que los originan como: carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas o mielomas. Los carcinomas son tumores malignos de células epiteliales o glandulares. Los sarcomas son tumores de los tejidos conectivos o de soporte (músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso). Las leucemias son tumores líquidos que se originan de las células de la sangre. Los linfomas y mielomas se originan de las células del sistema inmunitario. Además, hay cánceres del sistema nervioso central, los cuales suelen ser mortales debido a la interrupción normal de las funciones cerebrales. Los tumores también se pueden nombrar de acuerdo con el tejido y el órgano de origen como: carcinoma de pulmón o de mama. Las células tumorales durante su transformación adquieren características y todas se comparten en algún momento. En el año 2000, Hanahan y Weinberg revisaron las características distintivas del cáncer e incluyeron 6 características. Sin embargo, con el avance del conocimiento y el entendimiento de la enfermedad, una serie de observaciones los llevó a proponer nuevas características del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Ciertas características permiten a las células tumorales el surgimiento de otras como la inestabilidad genómica (mutaciones) y junto a la inflamación crónica promueven la aparición de nuevos sellos o características. Éstas características (Figura 4) son aplicables a casi cualquier tipo de cáncer y entre estas se encuentran:

Las señales proliferativas sostenidas son característica en donde las células tumorales las cuales producen sus propios factores de crecimiento y responden con la expresión de receptores afines, lo que da una estimulación proliferativa autocrina. Además, las células tumorales pueden inducir a las células vecinas a producir más factores de crecimiento (Cheng et al., 2008). También la señalización de los receptores puede desregularse o tener alteraciones estructurales en las moléculas

del receptor y derivar en la activación constitutiva en ausencia del ligando, estas alteraciones inducen una mayor proliferación de las células tumorales (Wang et al., 2006). Otras de las características es la evasión de los supresores del crecimiento. En esta característica las células tumorales presentan mutaciones en los genes supresores de los tumores (TP53 y RB) que codifican proteínas que pierden su función. De esta manera las células tumorales no tienen los puntos de control que inhiben la proliferación o les impidan progresar en el ciclo celular (Bookstein et al., 1990; Zilfou y Lowe, 2009). La resistencia a la muerte celular es otro de los sellos de esta enfermedad. La muerte celular o apoptosis es un mecanismo que elimina a las células asociadas a un estrés o daño a ADN. Sin embargo, las células tumorales presentan desregulación de las señales intrínsecas y extrínsecas apoptóticas que involucra la pérdida de la función de los receptores de muerte celular (ligando Fas y receptor Fas, TRAILR y TNFR) y la inactivación de las caspasas. Además de la sobreexpresión de proteínas reguladoras antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Sharma et al., 2019). La angiogénesis es otra de las características distintivas del cáncer. Durante el crecimiento tumoral los tumores requieren nutrientes y oxígeno, además de evacuar los desechos metabólicos, la angiogénesis responde a estas necesidades y estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Hanahan y Weinberg, 2000). Otras de las características es el potencial replicativo ilimitado. Durante la división celular, las células normales pierden parte del ADN que se encuentra en el extremo final de los cromosomas (los telómeros, compuesto por múltiples repeticiones de secuencias cortas de 6 pares de bases) esto genera la erosión de los telómeros y, por lo tanto, limita la división celular (Hanahan y Weinberg, 2000). Las células tumorales evitan la erosión de los telómeros debido a la expresión de la enzima telomerasa, la cual adiciona hexanucleótidos repetidos en los extremos finales de los cromosomas (Shay y Wright, 2000). La invasión de tejido y metástasis es el último de las características del cáncer. Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de invadir el tejido local y tejido distante (metástasis). Las células tumorales desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular. La pérdida o disminución de moléculas de adhesión como la E-cadherina y la expresión de moléculas asociadas a la migración como la N-cadherina se asocian a un aumento en la migración y por lo tanto a la formación de metástasis (Cavallaro y Christofori, 2004). En los últimos años, se han ido agregando nuevos sellos del cáncer como la desregulación del metabolismo celular y la evasión del sistema inmunitario (Figura 4) (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 4. **Sellos del cáncer.** Características de las células tumorales que le permiten que sean consideradas células malignas. Modificado de Douglas Hanahan y A. Weinberg, 2011.

1.4 Respuesta inmunitaria y Cáncer

El sistema inmunitario consta de órganos linfoides, células y componentes humorales, que se encargan de proteger al organismo de cualquier patógeno como bacterias, hongos, virus y células tumorales. El sistema inmunitario está compuesto por el sistema inmunitario innato y adaptativo. Una vez que el sistema inmunitario entra en contacto con alguno patógeno se genera una respuesta coordinada, denominada respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria débil generará susceptibilidad a infecciones o incapacidad de eliminar células tumorales o bien, en inmunodeficiencias; mientras una respuesta excesiva conlleva a reacciones de hipersensibilidad o enfermedades autoinmunes (Marshall et al., 2018).

La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa del organismo y se encarga del reconocimiento rápido de los agentes infecciosos, consta de 3 mecanismos de defensa: 1) Barreras anatómicas, estas se dividen en factores mecánicos (piel, células ciliadas del tracto respiratorio), factores químicos (cerumen, lisozimas y fosfolipasas) con actividad antimicrobiana y factores biológicos (la microbiota de la piel y el tracto gastrointestinal), 2) Respuestas humorales compuesta por el sistema de complemento y algunas citocinas (Interferón e IL-1) y 3) Componentes celulares, que consiste en las células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) y que son reclutados en una infección o proceso proinflamatorio (Smith et al., 2019).

La respuesta inmunitaria adaptativa lo constituyen las células T y B. Estas se caracterizan por ser antígeno específico y generar memoria inmunitaria. Los clones de células T y B reconocen los epítomos antigénicos a través del TCR (*T-Cell Receptor*) o BCR (*B-Cell Receptor*), los cuales son resultado de la recombinación genética en las células de la línea linfóide. Una respuesta inmunitaria adaptativa eficiente dependerá de los mecanismos celulares y humorales de la respuesta inmunitaria innata, entre éstos la presentación antigénica, la liberación de citocinas y quimiocinas. Esto es esencial para generar una respuesta inmunitaria adaptativa donde las células T CD8+ y CD4+ son importantes en la respuesta antitumoral. La respuesta inmunitaria adaptativa requiere de microambientes especializados donde las células puedan colaborar eficientemente. Las células T deben migrar a los órganos linfoides secundarios para encontrar al antígeno presentado por las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células B) en la molécula de clase I o II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y donde transcurre la activación de la célula T ante el reconocimiento de su antígeno. La activación correcta de las células T requiere de tres señales:

La primera señal es la interacción TCR/MHC, el receptor de la célula T interacciona con el epítipo/péptido presentado en las moléculas de clase I o II del MHC de las células presentadoras de antígeno, además de la interacción de las moléculas correceptoras CD8 o CD4. Las moléculas de clase I del MHC presentan péptidos/epítopos de 8 a 12 aminoácidos a las células T CD8+. Las moléculas de clase II del MHC presentan péptidos/epítopos de 13 a 25 aminoácidos a las células T CD4+, los sitios de anclaje del MHC II son más heterogéneos y presentan mayor polimorfismo que las moléculas de clase I (Kindt et al., 2007).

La segunda señal es la interacción de las moléculas coestimuladoras de la célula T (CD28, CD40L e ICOS) con la célula presentadora de antígeno (CD80, CD86, CD40 e ICOSL). La presencia de las moléculas inhibitorias (CTLA-4 y PD1) genera tolerancia o inhibición de la célula T (Kindt et al., 2007).

La tercera señal esta mediada por el microambiente de citocinas, la cual determinará el tipo de respuesta que se efectuará. Las células T CD8+ citotóxicas (CTL) son importantes en la eliminación de los patógenos intracelulares como los virus, además de la respuesta contra tumores, una vez activadas, las células migran por gradiente de quimiocinas al sitio de infección o al tumor. Las células Th0 CD4+ naive se pueden diferenciar a las células T cooperadoras (Th), estas a su vez pueden diferenciarse en varias subpoblaciones efectoras (Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, etc.). Si en el microambiente predomina la IL-12 y el IFN- γ , estos favorecerán la diferenciación hacia un perfil Th1 con la activación del factor de transcripción T-bet. A su vez, las células Th1 inducirán la expresión de la IL-2 y el IFN- γ , citocinas importantes para la activación de macrófagos y CTL, además que estimulan la síntesis de IgG opsonizantes y fijadores de complemento. En un microambiente donde predomina la IL-4 se favorecerá un perfil Th2 y la activación del factor de transcripción GATA-3 y se inducirá la síntesis de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25 (Montaño y Rendón, 2016). Este perfil es característico de la respuesta hacia los microorganismos y los parásitos, mediado por IgE, eosinófilos y mastocitos. Además, las citocinas expresadas por las células Th2 favorecen que las células B se diferencien en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Un microambiente con la IL-2 y el TGF- β se favorece la diferenciación a un perfil de células T reguladoras inducidas (iTreg), o Th3, y la activación del factor de transcripción Foxp3. Además, estas están asociadas con una regulación inmunitaria para mantener la tolerancia a lo propio y la homeostasis, también secretan TGF- β , mientras que las células Treg o Tr1, secretan IL-10. Las células Treg o Tr1 puede que no expresen Foxp3, lo que sugiere un fenotipo CD4+CD25+Foxp3- (Kindt et al., 2007; Montaño y Rendón, 2016). Las células Th CD4+ no son las únicas con propiedades reguladoras, existe una variedad de otros tipos celulares, como las células Treg CD8+, las dobles negativas (CD3+CD4-CD8-), NKTreg, Breg y T γ / δ , entre otras (Montaño y Rendón, 2016), que son consideradas como las causantes de controlar los mecanismos de tolerancia.

En el desarrollo del cáncer o carcinogénesis, las células transformadas expresan un patrón de moléculas proteicas que son reconocidas por el sistema inmunitario denominadas “Antígenos tumorales”, lo cual determinan un perfil antigénico. Los antígenos tumorales pueden ser antígenos específicos del tumor (*tumor-specific antigen*, TSA), que son moléculas que se generan como productos de las mutaciones somáticas no sinónimas (cambio puntual en la expresión génica y como resultado habrá un cambio en la proteína resultante) y, por lo tanto, solo son expresados exclusivamente en el tejido tumoral y también son altamente inmunogénicos debido a la falta de tolerancia central. Además, los TSA se pueden encontrar en los tumores inducidos por los virus producto de los epítomos virales (Hu et al., 2018; Fennemann et al., 2019). Los antígenos asociados al tumor (*tumor-associated antigen*, TAA) son moléculas propias no mutadas expresadas en los tumores, pero también se encuentran en los tejidos normales y se pueden clasificar en función de su patrón de expresión en los tejidos sanos. Por ejemplo, como los antígenos sobreexpresados, los antígenos de diferenciación y los antígenos derivados de línea germinal que están expresados en los tumores y que se encuentran en ciertos tejidos normales (Novellino et al., 2004; Hu et al., 2018). De esta manera el sistema inmunitario es capaz de reconocer a los TSA y a los TAA expresados por las células transformadas y generar una respuesta inmunitaria contra las células malignas, lo que forma parte del concepto que explica la relación entre el sistema inmunitario y el tumor, “la inmunoección del cáncer” (Figura 5). La inmunoección se divide en 3 etapas o fases: eliminación (inmunovigilancia), equilibrio y escape (Dunn et al., 2006).

Eliminación: en esta etapa ocurre “la inmunovigilancia”, las células malignas transformadas por los estímulos oncogénicos son identificadas por el sistema inmunitario innato mediante los patrones moleculares asociados a daño (DAMP) que son liberados por las células tumorales moribundas. A medida que el tumor crece las células expresan en su membrana las moléculas de estrés o las moléculas de clase I no clásicas del MHC (RAE-1, H60 en ratón y MICA/B en humanos y CD1b) y son reconocidos por los ligandos NKR de las células NK y son eliminadas. Lo que conlleva a la liberación de las citocinas proinflamatorias e inmunomoduladores y el reclutamiento de las células presentadoras de antígeno. Esto permite un microambiente que da paso a la respuesta inmunitaria adaptativa específica del tumor, con la activación de las células T CD8+ citotóxicas y las células Th CD4+ cooperadoras, que confieren la protección contra el desarrollo de los tumores (Kim et al., 2007; Mahmoud et al., 2017).

Equilibrio: fase en la cual no todas las células tumorales fueron eliminadas. Estas se mantienen crónicamente o en estado de latencia, son poco inmunogénicas y proliferan, hay un equilibrio entre la actividad citotóxica del sistema inmunitario y la proliferación tumoral. La inestabilidad genética de las células tumorales genera una selección inmune, lo que produce poblaciones nuevas de variantes tumorales, además de mutaciones que no estimulan una respuesta, lo cual confiere mayor

resistencia a la eliminación. Esta etapa se vuelve muy heterogénea y se considera la fase con mayor duración en el tiempo (Khong y Restifo, 2002; Vinay et al., 2015).

Escape: Las nuevas poblaciones de variantes tumorales poco inmunogénicas son insensibles a la detección y evaden el sistema inmunitario por varios mecanismos. Estas nuevas células proliferan y se desarrollan como un tumor clínicamente detectable, al mismo tiempo el sistema inmunitario resulta afectado por el deterioro del organismo (Khong y Restifo, 2002; Poggi y Zocchi, 2006; Schreiber et al., 2011). Entre estos mecanismos de evasión se encuentran los siguientes:

- Pérdida de la expresión de las moléculas de clase I del MHC y procesamiento de antígeno, debido a mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina y del gen del transportador TAP (Korkolopoulou et al., 1996; Hicklin et al., 1998).
- Citocinas inmunosupresoras secretadas por las células tumorales o por las células del estroma, como la secreción del TGF- β junto con la IL-10, que inhiben la activación de las células T e inhiben la producción de la IL-2, la IL-12 y el IFN- γ , estas últimas necesarias para la activación de las células T citotóxicas (Massagué et al., 2008; Llopiz et al., 2017). Adicionales a las citocinas inmunosupresoras, las células tumorales pueden secretar otros factores solubles inmunosupresores como el VEGF, indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y galectina-1 (Schreiber et al., 2011). Estos tienen impacto en la activación de las células T y células dendríticas (DC).
- Contraataque tumoral: Consiste en la expresión de ligandos de los receptores de muerte de la vía Fas/FasL. FasL se expresa en las células tumorales e interactúa con Fas en las células T o NK que infiltran en el tumor. La interacción de estas moléculas activa la cascada de caspasas e induce la apoptosis en las células T y NK activados (Igney y Krammer, 2005). También, se ha reportado la secreción de exosomas que contienen FasL y que se liberan durante la progresión tumoral.
- El reclutamiento de las células supresoras es favorecido por el microambiente tumoral. El aumento de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el sitio tumoral induce la inhibición de la actividad de las células T mediante la secreción de la IL-10 y el TGF- β , además del consumo de la IL-2 y la expresión de las moléculas inhibitorias (PD-1 y CTLA-4) que sirven como *checkpoints* inmunitarios (Syed Khaja et al., 2017; Li et al., 2020). Las células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSC), son una población heterogénea de células inmaduras que incluye monocitos y granulocitos ambas subpoblaciones muestran ser inmunosupresoras y secretan TGF- β , IL-6, IL-4, arginasa I y óxido nítrico sintasa inducible a través de las especies reactivas del oxígeno (Markowitz et al., 2013; Marvel et al., 2015; Secondini et al., 2017). También estos son señales inhibitorias para las células T, NK y DC.

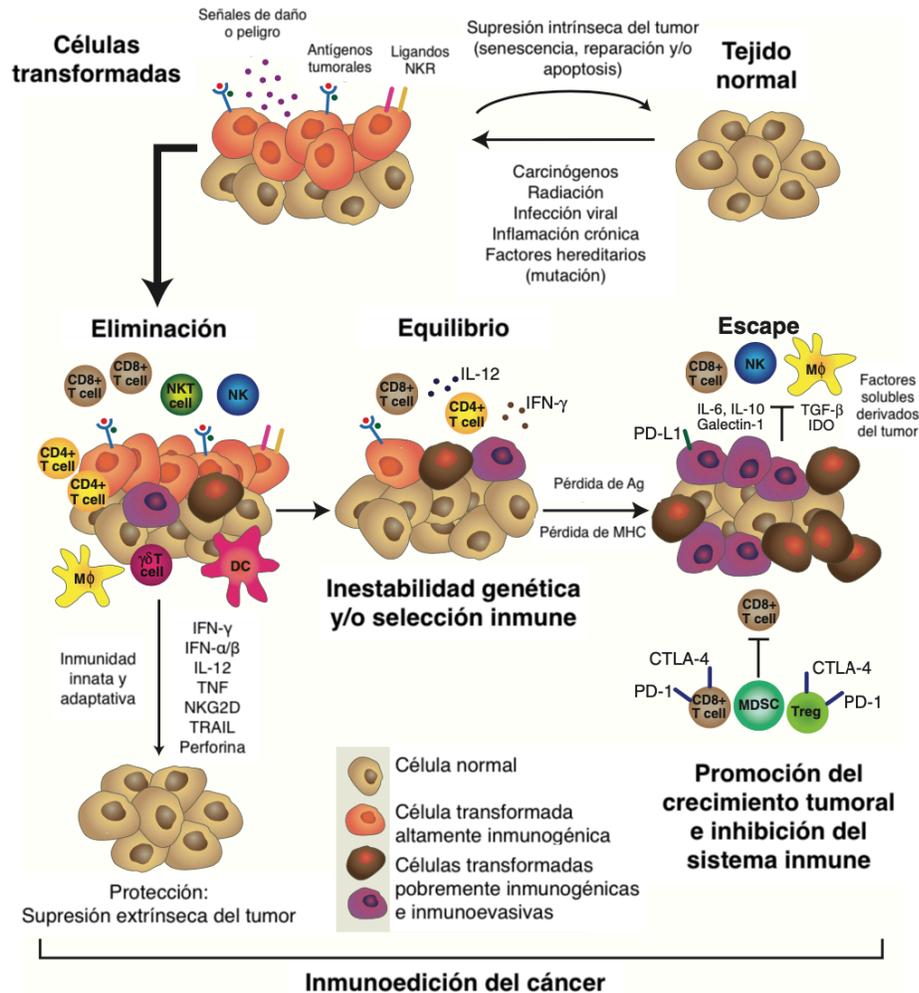


Figura 5. **Imunoedición del cáncer.** La teoría de la imunoedición consta de tres etapas: Eliminación, Equilibrio y Escape. Eliminación: Inicia con el proceso de carcinogénesis y transformación maligna de algunas células de tejido normal causado por los factores físicos, químicos y biológicos o factores hereditarios. Las células transformadas moribundas liberan DAMP y activan la respuesta innata. Las células tumorales expresan moléculas de estrés que son reconocidas por las células NK y las elimina. Esto conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de las células presentadoras de antígeno. Estas células presentan antígenos en las moléculas de clase I o II del MHC y activan a las células T CD8+ citotóxicas y las células Th CD4+ cooperadoras que eliminan a las células tumorales y generan protección. Equilibrio: Las células transformadas no son completamente eliminadas y la constante presión inmunitaria ejercida sobre las células tumorales genéticamente inestables mantenidas en equilibrio, puede generar variantes tumorales poco inmunogénicas lo que provoca una selección inmunitaria (esculpido). Hay un equilibrio entre la actividad citotóxica y la proliferación tumoral. Escape: subsisten variantes tumorales pobrementemente inmunogénicas e inmunoevasivas. Las células tumorales presentan pérdida de los antígenos y de la expresión del MHC. Además, secretan moléculas inmunosupresoras: TGF-β, IDO, galectina, IL-6, IL-10 y MICA/B soluble. También se reclutan a las células inmunosupresoras Treg, MDSC, macrófagos M2 que liberan citocinas y factores solubles que inhiben a las células del sistema inmunitario y se crea un microambiente que favorece el crecimiento tumoral y se manifieste clínicamente (Modificado de Schreiber et al., 2011).

1.5 Terapias convencionales contra el cáncer

Las terapias convencionales contra el cáncer generalmente incluyen: la cirugía, los agentes quimioterapéuticos y la radioterapia. La cirugía sigue siendo la estrategia principal para curar el cáncer de mama y consiste en extirpar el tumor primario sin afectar el tejido adyacente (Arruebo et al., 2011). A menudo es necesaria, además, la extirpación de los ganglios linfáticos axilares (Mastectomía radical modificada). En los últimos años el avance en el desarrollo de técnicas quirúrgicas y el uso de la terapia sistémica neoadyuvante ha permitido la conservación de la mama y se ha convertido en el principal objetivo quirúrgico sustituyendo la mastectomía (Harbeck et al., 2019). La cirugía conservadora de mama muestra beneficios de supervivencia que no son peores que la mastectomía (Sun et al., 2021). A pesar de la extirpación del tumor primario la cirugía no es capaz de eliminar a las células que han invadido el tejido adyacente o los que se han diseminado a otros órganos, incluso se ha propuesto que la cirugía pudiera inducir metástasis, ya que puede liberar células tumorales en el torrente sanguíneo (Tohme et al., 2017). Sin embargo, la cirugía es empleada en combinación con la quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento en el cual se utilizan moléculas que inhiben la proliferación celular de las células tumorales, en dependencia de su mecanismo de acción se incluyen: los taxanos que son fármacos que se unen a la tubulina lo que da lugar a la formación de haces de microtúbulos estables y no funcionales y, por tanto, interfieren con la mitosis e inducen la apoptosis en las células (Crown y O'leary, 2000). Los agentes alquilantes incorporan grupos alquilos al ADN y forman puentes inter o intracatenarios responsables de la alteración y daño del ADN, por último, generan la muerte celular (Litterman et al., 2013). Otros agentes quimioterapéuticos como los antimetabolitos que inhiben la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas e inducen la eliminación de nucleótidos y provocan la inhibición de la replicación del ADN, otros se incorporan al ADN y generan errores estructurales aumentando así la muerte celular (Lansiaux, 2011; Peters, 2014). Los antibióticos antitumorales son principalmente péptidos y antraquinonas, actúan insertándose entre pares de bases del ADN donde se unen estrechamente y pueden formar un complejo con el ADN e inhibir la función de la ARN polimerasa para así parar la síntesis del ARN y promover la apoptosis de las células tumorales (Gao et al., 2020). Los inhibidores de la topoisomerasa I y II, que son enzimas implicadas en el desenrollamiento del ADN durante la replicación y transcripción, su inhibición lleva a que no se forme la horquilla de replicación lo que induce la muerte de las células (Hevener et al., 2018).

Los agentes quimioterapéuticos son capaces de afectar y eliminar a las células malignas y sanas, ya que también poseen los componentes que son blancos de estos fármacos, lo que causa muchos efectos secundarios en los pacientes (anemia, leucopenia, disfunción cardíaca, gastrointestinales, pérdida de cabello, diarrea, problemas renales, disfunciones cognitivas y neuropatía periféricas)

(Nurgali et al., 2018). A menudo la quimioterapia se combina con otros fármacos para mejorar la respuesta, sin embargo, un problema importante de estos tratamientos es la resistencia al fármaco. La radioterapia se suele utilizar después de la cirugía donde se extirpó un tumor, esta terapia se basa en inducir un haz de radiación de alta energía hacia el sitio del tumor y sus alrededores, la radiación ionizante induce daño al ADN de las células expuestas a la radiación, lo que lleva a la muerte celular. Aproximadamente, el 60-65 % de los pacientes con cáncer reciben la radioterapia como parte de su tratamiento, ya sea en combinación con la cirugía o con los agentes quimioterapéuticos (Mehta et al., 2010). Sin embargo, esta terapia continúa teniendo fuertes efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes, además que se limita la cantidad de radiación que puede aplicarse. Dependiendo del estadio del cáncer las terapias convencionales pueden ser ineficaces para controlar el crecimiento y la propagación de las células tumorales.

1.6 Inmunoterapias contra el cáncer

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer que se centra en potenciar la respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Esta terapia utiliza los componentes del sistema inmunitario para reconocer y eliminar a las células tumorales. Existen diferentes tipos de inmunoterapias contra el cáncer, en dependencia como actúa la inmunoterapia con respecto al sistema inmunitario del paciente se puede clasificar como inmunoterapia pasiva y activa (Galluzzi et al., 2014).

La inmunoterapia pasiva: se suministra los componentes activos al paciente (actividad intrínseca), por ejemplo, la transferencia adoptiva de las células T y el uso de los anticuerpos (Figura 6). En la transferencia adoptiva de las células T, se extraen las células T de la sangre periférica o del tejido tumoral (*peripheral blood lymphocytes*, PBL y *tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL) del paciente y se expande *in vitro*. Los TIL se pueden expandir de forma no específica ya que son preferentemente específicos de tumores antes del cultivo. En los PBL la especificidad tumoral se induce mediante la expansión específica de antígeno o por ingeniería genética. Después de varias semanas de expansión en cultivo y una vez seleccionadas las células T específicas del tumor se reinfunden al paciente acompañado de citocinas estimuladoras y de un tratamiento previo (Dudley et al., 2008; Perica et al., 2015). También se ha empleado la transferencia adoptiva de las células T modificadas genéticamente que expresan receptores de antígenos quiméricos (*Chimeric antigen receptor T cell therapy*, CAR-T). Las CAR-T expresan un dominio extracelular de unión al antígeno de una inmunoglobulina fusionado a un dominio transmembrana y al dominio de señalización intracelular que guía a la activación de las células T (dominio CD3z ITAM y dominios coestimuladores CD28 o CD137). Esto permite reconocer y eliminar a las células tumorales que expresan el antígeno asociado al tumor de interés, sin la necesidad de la presentación de los

péptidos en las moléculas del MHC (Ahmad et al., 2020). Hasta ahora, la FDA (de sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) ha aprobado algunas terapias CAR-T para neoplasias malignas hematológicas. Sin embargo, todavía hay desafíos que deben abordarse como las toxicidades (el síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad).

El uso de los anticuerpos monoclonales que alteran específicamente las funciones de señalización de los receptores expresados en la superficie de las células tumorales; se unen y, por lo tanto, inhiben las vías de señalización necesarias para la supervivencia o progresión de la células tumorales, o pueden activar los receptores de muerte celular potencialmente letales para ellos. Algunos anticuerpos aprobados por la FDA pueden producir citotoxicidad y fagocitosis celular mediada por los anticuerpos y, además, citotoxicidad dependiente de complemento y opsonización (Figura 6). Asimismo, inmunoconjugados, es decir, anticuerpos monoclonales específicos a TAA acoplado o conjugado a toxinas (Prang et al., 2005; Kute et al., 2012; Galluzzi et al., 2014; Overdijk et al., 2015).

La inmunoterapia activa consiste en activar los componentes del sistema inmunitario en el paciente. Algunos ejemplos de inmunoterapia activa son los inhibidores de puntos de control inmunitario, las terapias con citocinas y las vacunas terapéuticas (Figura 6) (Galluzzi et al., 2014). En las últimas décadas se han identificado y estudiado varias moléculas inhibitoras (PD-1/PDL1, CTLA-4, LAG3, TIM3) que contribuyen a la regulación del sistema inmunitario y evitan que se dañen los tejidos propios por autoinmunidades o infecciones. En el cáncer, las moléculas inhibitoras regulan de forma negativa la actividad efectora de las células T, como moléculas de superficie su actividad se puede inhibir al bloquear esas vías con los anticuerpos monoclonales y evitan el acoplamiento ligando-receptor y así se potencia la respuesta antitumoral. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra CTLA-4 fue el primer ICI aprobado por la FDA en el 2011 para el tratamiento de los pacientes con melanoma avanzado III/IV. El tratamiento con ipilimumab demostró aumentar la respuesta antitumoral y la sobrevida en los pacientes (Hodi et al., 2010; Khan et al., 2021). Pembrolizumab y nivolumab son anticuerpos monoclonales que reconocen a PD-1, estos mostraron resultados prometedores en pacientes con melanoma y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y su efecto antitumoral condujo que se aprobaran en el 2014 por la FDA (Borghaei et al., 2015; Garon et al., 2015; Ribas et al., 2016). Actualmente se encuentran en ensayos clínicos de fase IV para neoplasias malignas (Darvin et al., 2018). Cada vez más se han ido desarrollando nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos a bloquear la vía PD-1/PDL1 y a nuevas moléculas inhibitoras. A pesar del éxito de la inmunoterapia con los ICI en algunas neoplasias con alta carga mutacional, en los que han inducido la regresión del tumor todavía presentan desventajas, por ejemplo, solo un subconjunto de pacientes muestra capacidad de respuesta (Durgeau et al., 2018; Fennemann et al., 2019). Además, pueden llevar a eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario, lo que

conduce a diversas respuestas autoinmunes locales y sistémicas que generalmente no son graves, pero en casos raros, pueden conducir a la muerte (Ramos-Casals et al., 2020). No obstante, los ICI han revolucionado el campo de la inmunoterapia.

Las citocinas son glicoproteínas solubles secretadas por diversos tipos celulares que median la comunicación intercelular de forma autócrina, paracrina y endócrina (Galluzzi et al., 2014). La acción que ejercen se asocia con la regulación del crecimiento y diferenciación, activación y respuesta de poblaciones celulares de la respuesta inmunitaria (Montaño y Rendón, 2016), además de que regulan la hematopoyesis. De esta manera las citocinas son importantes en el sistema inmunitario. Desde los años 80, la terapia con citocinas para activar el sistema inmunitario en pacientes con cáncer ha sido una modalidad de tratamiento importante. En el año 1986, se aprobó el IFN- α como tratamiento de leucemia de células pilosas y con el tiempo fue aprobado para tratamientos de linfoma no Hodgkin folicular, melanoma y sarcoma de Kaposi. (Goldstein y Laszlo, 1988; Berraondo et al., 2019). Posteriormente, en el año 1992, la IL-2 fue aprobado para el tratamiento del cáncer de células renales metastásico y más tarde aprobado para melanoma avanzado (Jiang et al., 2016). También ha sido aprobado el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) como adyuvante en pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos (Lazarus et al., 2021). En los últimos años, varias citocinas (IFN- γ , IL-7, IL12, IL-15 y IL-21) se han probado en los ensayos clínicos y siguen en investigación. Sin embargo, hay factores que limitan su eficacia como toxicidades que limitan la dosis, la inducción de las células Treg y MDSC, que inducen citocinas inhibitorias como la IL-10 y el TGF- β y la estimulación de la expresión de las moléculas inhibitorias (PD-1/PDL1, CTLA-4) (Conlon et al., 2019). A pesar de ello, se siguen probando nuevos enfoques para mejorar la eficacia de la terapia como la ingeniería de citocinas para generar mayor afinidad de unión al receptor y disminuir proporcionalmente la estimulación de células Treg, proteínas de fusión quiméricas de anticuerpos-citocinas, tratamientos combinados de citocinas con ICI y vacunas contra cáncer (Conlon et al., 2019). No obstante, la monoterapia con citocinas ha generado solo respuestas modestas en el cáncer.

Otro de los tratamientos prometedores son las vacunas terapéuticas contra el cáncer que consisten en fortalecer la activación del sistema inmunitario del paciente para que sea capaz de reconocer y eliminar a las células tumorales (Figura 6). Las vacunas terapéuticas contra el cáncer basadas en la respuesta celular se empezaron a desarrollar en la década de 1980 desde el descubrimiento de los antígenos tumorales restringidos por las moléculas del MHC (Zinkernagel y Doherty, 1974, 1997). Sin embargo, elegir un blanco correcto es fundamental en el diseño de una vacuna. En las vacunas contra el cáncer los blancos antigénicos, tradicionalmente, se han basado en los TAA y los TSA. Este último es el más usado en los años recientes. Actualmente, existen varias formulaciones de vacunas contra el cáncer, de manera similar, la lista de sistemas de entrega, programas de vacunación y adyuvantes que se están probando es extensa (Shemesh et al., 2020).

Las vacunas con base en las células dendríticas (DC) consisten en la obtención de los monocitos circulantes de un paciente o donante para su expansión y diferenciación *ex vivo* a DC maduras con el GM-CSF en presencia de los antígenos tumorales (TAA o TSA) en forma de péptidos, ADN, ARNm, vectores de expresión y lisado de las células tumorales para su posterior reinfusión al paciente (Song et al., 1997; Redman et al., 2008; Wilgenhof et al., 2011; Vacchelli et al., 2012). Con este enfoque se pretende que las DC procesen y presenten los antígenos tumorales en las moléculas de clase I o II a las células T y activen a las células T CD8+ y CD4+ capaces de reconocer y eliminar a las células tumorales, por este motivo, han sido el centro de una amplia gama de estudios clínicos (Wculek et al., 2020). La FDA en el 2010, aprobó por primera vez una vacuna terapéutica contra el cáncer para uso humano llamada Sipuleucel-T, esta vacuna consistía en DC autólogas de los pacientes con cáncer de próstata metastásico y que va dirigido a una fosfatasa ácida prostática, los resultados mostraron aumento de supervivencia media de 4 meses al compararse con el placebo (Kantoff et al., 2010; Cheever y Higano, 2011). Sin embargo, la relación costo/beneficio no fue satisfactorio. Otras formas de vacunas que se utilizan son los péptidos sintéticos derivados de los antígenos tumorales (TAA o TSA) que se administran junto con un adyuvante o agentes inmunoestimuladores (Pavlick et al., 2020). De este modo se trata de activar a las células CD8+ y CD4+ específicos por el epítipo incluido en la vacunación (Lam H et al., 2021).

Por otro lado, otra forma de vacuna es el uso de ADN recombinante que codifica los antígenos tumorales para expresar selectivamente o asegurar una modificación postraduccional adecuada. La vacuna de ADN se basa en secuencias de ADN que se incorporan en plásmidos o vectores virales y pueden ser inyectados directamente en el paciente, transfectados a las DC o utilizar métodos físicos (electroporación, sonoporación, *gene gun*, etc) para ingresar al núcleo de la célula. Una vez codificado el antígeno, debe ser procesado y presentado en las moléculas de clase I y II del MHC para la activación de las células T CD8+ y CD4+. Este formato activa indirectamente la inmunidad humoral y las características del plásmido puede también activar la respuesta innata (Tang y Pietersz, 2009; Li et al., 2016; Lopes et al., 2019, 2021). Desafortunadamente, el éxito en las vacunas terapéuticas en cánceres todavía está limitada incluso en modelos preclínicos, las vacunas de ADN inhiben el crecimiento tumoral y generan respuesta inmunitaria, pero rara vez son capaces de eliminar el tumor.

En los últimos años, ha disminuido los costos de la secuenciación del genoma y ha aumentado el avance en el desarrollo de los algoritmos de predicción, análisis y selección de los antígenos que son reconocidos por las moléculas de clase I o II del MHC. Esto ha permitido que se detecten neoantígenos de tumor específicos de cada paciente cada vez más frecuente y que se desarrollen vacunas de neoepítomos personalizadas (Lee et al., 2018). Las vacunas de neoepítomos se han probado en los diferentes formatos ya descritos previamente. Actualmente, las vacunas de neoepítomos basadas en ARNm pueden codificar la secuencia completa o parcial

del TSA. Además, combina el potencial de adyuvante como coestimulación mediada por activación de la respuesta innata (Beck et al., 2021). Se ha demostrado que el uso de las vacunas de neoepítomos basadas en ARNm induce respuesta de células T específico de neoepítomos y una supervivencia libre de progresión y una disminución de la metástasis en algunos pacientes (Ott et al., 2017; Sahin et al., 2017). A pesar de la potencia de las vacunas de neoepítomos, estas no han avanzado en las siguientes fases de ensayos clínicos debido a que han mostrado respuesta clínica limitada (Hu et al., 2021). Esto se debe a que el panorama de los neoantígenos en el tumor está constantemente en cambios dinámicos de ganancia y pérdida de expresión durante el proceso de inmunoección y los neoantígenos supervivientes son pocos inmunogénicos además de los mecanismos de evasión todavía presentes en el tumor (Marty et al., 2017).

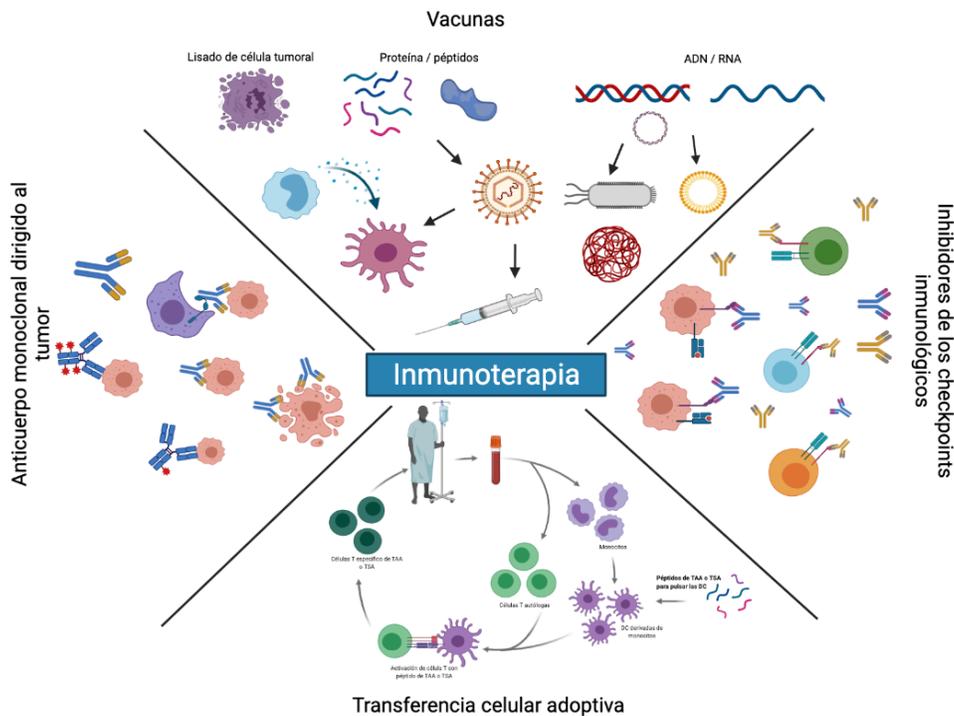


Figura 6. **Inmunoterapias contra cáncer.** Inmunoterapia pasiva: Transferencia celular adoptiva y anticuerpos monoclonales dirigido al tumor. Inmunoterapia activa: Vacunas contra cáncer e inhibidores de los *checkpoints* inmunitarios. Otras moléculas que se incluyen en las inmunoterapias: las citocinas inmunoestimuladoras.

1.7 Obstáculos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer

Todavía existen muchos problemas no resueltos para el desarrollo de tratamientos exitosos contra el cáncer, una de las principales dificultades a considerar para el desarrollo de una vacuna es una buena elección del inmunógeno que permita estimular la respuesta inmunitaria y romper la tolerancia. El avance de la tecnología en estos temas y la disminución de costos durante los últimos años ha permitido el incremento en el descubrimiento e identificación molecular de antígenos tumorales para aplicaciones clínicas (Ott et al., 2017; Sahin et al., 2017); se sabe que los antígenos tumorales son reconocidos por el sistema inmunitario y activan a las CTL, células Th y células B. Es evidente que estos antígenos podrían ser una diana o blanco que induzcan respuesta de células T antitumoral y podrían establecer nuevas estrategias de múltiples procesos de vacunas contra el cáncer. Sin embargo, no existe una vacuna que sea eficaz para erradicar el cáncer, aún existen obstáculos que implican la respuesta inmunitaria contra el cáncer e impiden el éxito de la vacuna. Algunos obstáculos son las siguientes:

Carga mutacional: es el número total de mutaciones o cambios que se encuentran en el ADN de las células tumorales y en dependencia del número de mutaciones es probable que el paciente responda al tratamiento. Sin embargo, en la masa tumoral existen variantes tumorales con diferentes características inducidas por la respuesta inmunitaria lo que provoca una variabilidad genética y/o antigénica en las células. Epítomos mutados: durante la transformación oncogénica la acumulación de mutaciones puede llevar a la generación de nuevos epítomos (neoantígenos) e inducir una respuesta de células T más fuerte. Sin embargo, la presión selectiva por las respuestas de las CTL específicas por los antígenos tumorales provoca pérdida y/o ganancia de epítomos. Además, la tolerancia inmunológica por parte de las células Treg juega un papel fundamental para mantener la tolerancia o la ausencia de respuesta frente antígenos propios y evitar las enfermedades autoinmunes. Un tipo de tolerancia inmunológica es la anergia donde la activación de las células T es impedida por falta de las señales coestimuladoras o segunda señal. La senescencia y la exhaustación están asociados a la disfunción de las células T en las infecciones crónicas y cáncer. La senescencia se desencadena por el acortamiento o la erosión de los telómeros y señales de daño, incluido el estrés oxidativo, los agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN. Las células Treg naturales y las derivadas de tumor, además de las células tumorales, suprimen a las células T naive/efectoras, lo que resulta en la senescencia. La exhaustación se desencadena ya que las células T están expuestas a antígeno persistente y no se eliminan rápidamente, sino que persisten en el tiempo, lo que conduce a la estimulación crónica y provoca pérdida de proliferación celular, defecto en la producción de citocinas además de la expresión de moléculas inhibitorias y de factores de transcripción (Blimp-1, NFAT, T-bet y Eomes) y potencialmente al agotamiento y la delección clonal de las células T específicas del patógeno. Repertorio de células T

reducido, este obstáculo implica los mecanismos de evasión que afectan directa o indirectamente la actividad efectora de las células T además de tratamientos como la quimioterapia lo que provoca una reducción de la población de células T. El microambiente tumoral inmunosupresor es contribuido por las células Treg, las MDSC, citocinas inmunosupresoras, moléculas inhibitorias y factores solubles inmunosupresoras secretadas por las células tumorales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antígeno oncofetal, proteína del receptor de laminina inmadura (OFA/iLRP)

Durante el desarrollo embrionario, la placenta se comporta de muchas formas como un tumor. La placenta crece hasta una masa de 500 gramos, invade tejido vecino, establece vasculatura compleja y escapa del sistema inmunitario, todas características clave del desarrollo de un tumor sólido (Holtan et al., 2009). Además, se comparten varias proteínas oncofetales entre la placenta, los tumores y el tejido fetal. La expresión de protooncogenes, mutaciones y los cambios postraduccionales hacen que las proteínas expresadas normalmente se conviertan en antígenos tumorales (Cheever et al., 2009). Un ejemplo es el antígeno oncofetal OFA/iLRP, el cual es una proteína inmunogénica de 37 kDa, que consta de 295 aminoácidos y se conserva, con una diferencia de solo dos aminoácidos entre la de humanos y la de roedores. Este antígeno se ha detectado en varios tipos de tumores como en el cáncer de mama, pulmón, ovario, próstata, renal, cabeza, cuello y en neoplasias hematológicas (Barsoum y Schwarzenberger, 2014), además de su expresión en células embrionarias. La expresión de OFA/iLRP en la ontogenia ocurre desde el comienzo hasta la mitad de la gestación del desarrollo embrionario (ratón: día 13; hámster: día 11; humano: final del segundo trimestre), pero al término del desarrollo fetal y en los tejidos adultos ya diferenciados, OFA/iLRP no se encuentra inmadura y deja expresarse como inmunogénico detectable, lo cual impide la respuesta de las células T citotóxicas y la respuesta de anticuerpos anti-iLRP (Cogginet al., 1980, 2004; Rohreret al., 2006; Barsoumet al., 2009). Sin embargo, en casos raros es responsable de abortos espontáneos (Janerich, 2001). La expresión de OFA/iLRP en células embrionarias pueden participar en la formación invasiva del trofoblasto en la decidua uterina (Zhang et al., 2000).

OFA/iLRP en su forma madura (mLRP) es una proteína acilada dimérica de 67-KDa que se asocia con galectina-3. No es inmunogénica se presenta en la mayoría de las células normales y se asocia a la laminina de las membranas basales para estabilizar la unión de la laminina a las integrinas de la superficie celular (Castronovo et al., 1991, 1993; Ménard et al., 1998). El mecanismo por el cual OFA/iLRP se convierte en mLRP, no está claro ya que no se encuentra detallada. Sin embargo, el estudio más acertado sugiere que involucra la acilación postraducciona de ácidos

grasos (ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido esteárico) en residuos de cisteína, serina y treonina, acoplada con homo o heterodimerización con β -galactina (Landowski et al., 1995; Butò et al., 1998; Barsoum et al., 2009; Vania et al., 2019). OFA/iLRP en los tumores se expresa durante la transformación temprana de la célula maligna y es fundamental para su función de invasión y metástasis, así como el mantenimiento de la viabilidad celular y la mejora de la proliferación celular. La adhesión de una célula metastásica está mediada por OFA/iLRP y la laminina-1 de la matrix extracelular, lo que da como resultado la activación de la colagenasa, que conduce a la degradación de la lámina basal seguida de la invasión de las células tumorales en el torrente sanguíneo y metástasis (Barsoum et al., 2009; Jovanovic et al., 2015). La sobreexpresión de OFA/iLRP promueve una mayor agresividad tumoral y un mayor potencial metastásico.

La expresión de OFA/iLRP durante el desarrollo embrionario y en tumores, induce respuestas epítipo específicas de CTL y Th1 (Rohrer et al., 1999, 2006; Siegel et al., 2003, 2006), además estimula la producción de inmunoglobulinas de los isotipos IgG e IgM, que son capaces de reconocer y eliminar selectivamente a las células tumorales que expresan OFA/iLRP en los tumores humanos y murinos, evidencia de una respuesta inmunitario coordinada contra OFA/iLRP (Coggin y Anderson, 1974; Siegel et al., 2003; Rohrer et al., 2006; Friedrichs et al., 2008; McClintock et al., 2015). Asimismo, las respuestas de CTL y anticuerpos pueden tener reactividad cruzada, independientemente de la fuente de OFA/iLRP (Barsoum y Schwarzenberger, 2014). En la figura 7, se muestra la estructura tridimensional de OFA/iLRP (PDB 7CPU, 7CPU_2, UniProt P14206).

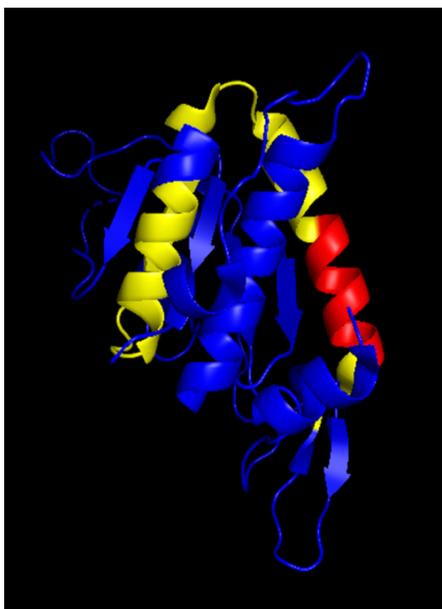


Figura 7. **Estructura tridimensional completa de OFA/iLRP.** OFA/iLRP la constituye 295 aminoácidos. El color amarillo y rojo constituye una secuencia de 43 aminoácidos multiepitópica y de color rojo un epítipo de 9 aminoácidos, se emplearon para la construcción de las Bibliotecas de Epítopos Variables. Generado en Pymol.

2.2 Vacunas de péptidos alternativos o mimótopos

Se ha demostrado que la mayoría de las células infiltrantes de tumor reconocen los epítomos derivados de TAA, pero un problema con estos blancos es que son menos inmunogénicos en comparación con los epítomos derivados de virus o neoantígenos (Gee et al., 2017). Además, las células infiltrantes de tumor que reconocen con una elevada afinidad a los epítomos de los antígenos silvestres del tumor son eliminados en el timo. Durante varios años, el uso de ligandos peptídicos alterados (APL) o mimótopos, se ha utilizado para contrarrestar esto. Los APL pueden contener sustituciones de aminoácidos en los residuos de anclaje a la molécula de clase I por residuos que son óptimos, de esta forma puede aumentar la afinidad del péptido por la molécula de clase I y, por ende, aumentar la inmunogenicidad (Lazoura et al., 2009). Otra estrategia para la generación de APL es la sustitución de los residuos centrales del epítomo que están en contacto directo con el TCR (Ekeruche-Makinde et al., 2012), lo importante de esto, es que un TCR de una célula T puede reconocer hasta 1 millón de secuencias de péptidos distintos (Wooldridge et al., 2012). Además, el uso de APL en el tratamiento del cáncer y de los patógenos antigénicamente variables se basa en la reactividad cruzada de las células T, lo que permite que el repertorio de epítomos distintos que pueda reconocer una célula T efectora sea mayor. Este enfoque está estrechamente relacionado con este trabajo en el que modificamos el 20 al 30 % de los residuos dentro de un epítomo inmunodominante de célula T CD8+ y son reemplazados por cualquiera de los 20 aminoácidos (Servín-Blanco et al., 2016). En dependencia del número de residuos sustituidos se genera una biblioteca que contiene un repertorio de miles a millones de variantes del epítomo silvestre. De esta manera, estamos potenciando la capacidad de los TCR para reconocer un amplio repertorio de variantes de la biblioteca derivada de la TAA y de esta forma eliminar a las células tumorales.

2.3 Biblioteca de epítomos variables

En nuestro grupo de trabajo utilizamos una nueva estrategia de inmunoterapia activa denominada Biblioteca de epítomos variables (BEV) que consiste en generar variantes de un epítomo de célula T CD8+ proveniente de un antígeno asociado a tumor con base en la predicción de unión del epítomo a la molécula de clase I del MHC. El repertorio de variantes del epítomo se genera al introducir sustituciones en una serie de posiciones dentro del epítomo silvestre por cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, respetando así los sitios de anclaje a la molécula de clase I del MHC. De esta forma si se sustituye 1 solo residuo se obtiene 20 variantes y si se sustituyen 2 residuos son 400 variantes, y si son 3 residuos obtenemos 8000 variantes (Figura 8), cálculo por combinatoria. Lo que se persigue es activar un amplio repertorio de células T utilizando este amplio repertorio de las bibliotecas y de esta manera eliminar a las células tumorales. Las

BEV pueden expresarse por medio de la técnica despliegue en bacteriófago en la proteína pVIII del bacteriófago M13 o como péptido sintético o bien células dendríticas activadas con los péptidos/epítomos (NoeDomínguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020).

SAPDNRPAL
SAXDXRXAL

X representa cualquiera de los 20 aminoácidos

Figura 8. **Biblioteca de Epítomos Variables**. El epítomo silvestre o nominal proviene de Mucina 1 (un TAA). La X representa posiciones aleatorizadas en la biblioteca y se sustituye por cualquiera de los 20 aminoácidos, dicha biblioteca tiene una complejidad teórica de 8000 variantes del epítomo.

En 2009, se demostró que las células T inducidas por los inmunógenos BEV reconocían más del 50 % de las variantes mutadas de un epítomo de célula T citotóxicos derivados del asa V3 gp120 del VIH-1 y los sueros de ratones inmunizados eran capaces de neutralizar 5 de 10 aislados virales primarios de un panel de referencia de nivel 2 para VIH-1 (Pedroza-Roldan et al., 2009; Charles-Niño et al., 2011). En ese mismo año, Lazoura y colaboradores, informaron que péptidos con posiciones de anclaje no canónicas con unión a la molécula de clase I inducen mejores respuestas celulares, es decir, cambios puntuales en ciertas posiciones del péptido facilita el reconocimiento celular y un aumento en la respuesta CTL específica (Lazoura et al., 2009). En 2014, Domínguez-Romero y colaboradores, utilizaron el concepto de BEV a partir de un epítomo de la proteína survivina de cáncer de mama, la aplicación de dichos inmunógenos en tratamientos profilácticos y terapéuticos demostraron reducir la tasa de crecimiento tumoral en un modelo murino de adenocarcinoma de mama (NoeDomínguez-Romero et al., 2014). Para 2018, se generaron 2 inmunógenos BEV multiepítómicos derivados de las moléculas de clase I clásica y no clásica del MHC, H2-Kd y Qa-2, respectivamente. Estas BEV demostraron una reducción significativa en el crecimiento tumoral y en la inhibición de las lesiones metastásicas en los pulmones de los ratones portadores de tumor (Servín-Blanco et al., 2018). Recientemente, se han generado varias BEV multiepítómicas del TAA de survivina y demostraron inducir inhibición del crecimiento tumoral y una fuerte reducción de las lesiones metastásicas en los pulmones de los ratones. Además, se demostró un aumento en la infiltración de células T en el tumor. Asimismo, respuestas inmunes celulares amplias inducidas por la vacuna en el bazo, el tumor, el pulmón y una reducción de las células inmunosupresoras (Domínguez-Romero et al., 2020).

Las vacunas contra los patógenos antigénicamente variables y el cáncer basadas en las BEV, se fundamentan en que estos inmunógenos contienen una

gran cantidad de variantes del epítipo silvestre proveniente del TAA, lo que permite la presentación simultánea de los epítomos modificados al sistema inmunitario e induce la activación de un repertorio amplio y diverso de células T capaces de reconocer no solamente al epítipo silvestre sino también a la mayoría de las variantes del epítipo (Figura 9). Teniendo en cuenta que durante la maduración de las células T el repertorio del TCR viene dada por la diversidad aleatoria de los múltiples segmentos génicos presente en los dominios variables ($V\alpha$ y $V\beta$) y de la diversidad de unión, lo que permite el reconocimiento de una amplia gama de antígenos, asimismo los epítomos mutados derivados del cáncer son de origen aleatorio y las bibliotecas combinatorias en su complejidad de las variantes portan mutaciones aleatorias en ciertas posiciones. Además, que el TCR de una célula T puede reconocer hasta 1 millón de secuencias de péptido distintos (Wooldridge et al., 2012). Esto nos permite estar un paso delante de esa variabilidad genética y/o antigénica de los patógenos antigénicamente variables y el cáncer, pudiendo eliminarlo. Este concepto propone la aplicación de las BEV que llevan bibliotecas combinatorias de variantes de epítomos como un enfoque de desarrollo de vacunas moleculares contra el cáncer.

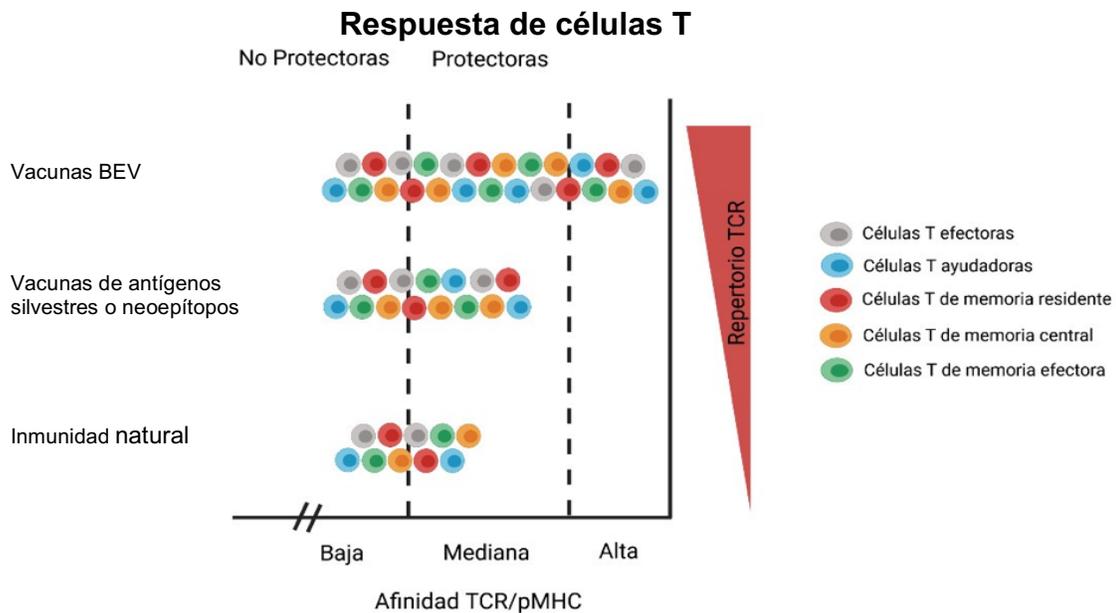


Figura 9. Inmunógenos vacunales basados en las BEV. El sistema inmunitario responde de forma natural a la infección por los patógenos antigénicamente variables y el cáncer mediante la generación de un repertorio limitado de células T con una afinidad baja-mediana por los epítomos unidos a las moléculas de clase I del MHC (TCR/pMHC). Las vacunas con epítomos silvestres o neoepítomos inducen un repertorio mayor de las células T, pero de manera similar reconocen a los epítomos con afinidad baja-mediana, sin brindar protección contra los patógenos antigénicamente variables y el cáncer. Las vacunas basadas en las BEV inducen la activación de un repertorio amplio y diverso de células T con una afinidad baja-mediana-alta de los TCR por los epítomos. Las células T activados por las BEV son capaces de reconocer no solamente al epítipo silvestre sino también a la mayoría de las variantes del epítipo y, por consiguiente, contener la infección por los patógenos antigénicamente variables y el desarrollo del cáncer.

2.4 Despliegue en bacteriófago

En este proyecto de investigación proponemos el uso de un concepto nuevo para la elaboración de vacunas para inducir una respuesta inmunitaria amplia que contrarreste la variabilidad antigénica del cáncer, que consiste en una biblioteca de epítomos variables, generando variantes de un epítomo silvestre. Estas variantes pueden expresarse mediante la tecnología despliegue en bacteriófago en la proteína pVIII del bacteriófago M13. El despliegue en bacteriófago es una técnica molecular de expresión de péptidos o proteínas fusionadas genéticamente a alguna de las proteínas de superficie (Proteína pIII o pVIII) del bacteriófago y permite además empaquetar el correspondiente ADN codificante dentro del bacteriófago recombinante (Figura 10). El bacteriófago más usado como sistema de despliegue es el M13, debido a que infecta específicamente a la bacteria *E. coli*, es fácil de manejar y es resistente a diferentes condiciones de estrés. Además, como partículas antigénicas, pueden entrar en ambas vías del procesamiento y presentación del antígeno de la molécula de clase I y II del MHC de este modo son capaces de inducir una respuesta inmunitario humoral y celular (Manoutcharian, 2005). Aunque también se han utilizados otros bacteriófagos como el bacteriófago λ (Marvin et al., 1998).

El bacteriófago M13, pertenece al género de los Inovirus, presenta un diámetro de 6.5 nm y una longitud de 930 nm, su masa total está constituida por un 87 % de proteína. Posee un genoma de ADN de cadena sencilla (ADNss), infecta a la bacteria *E. coli* a través del pilli F; se ensambla en la membrana bacteriana sin causar lisis celular. El genoma del bacteriófago tiene una longitud de 6 407 pares de bases y contiene la información necesaria para la síntesis de sus 11 proteínas, tiene una morfología cilíndrica, la cápside está formada principalmente por la proteína pVIII con 2700 copias y en ambos extremos las proteínas pIII, pVI, pVII y pIX con 3 a 5 copias por cada bacteriófago, como se observa en la figura 10 (Sidhu, 2001), las proteínas que participan en el ensamblaje y transporte de las partículas virales (pI, pIV y pXI) y las involucradas en la síntesis de ADN (pII, pV y pX) (Mullen et al., 2006; Qi et al., 2012; Sioud, 2019). Los péptidos/epítomos son clonados con mayor frecuencia en el gen VIII de la proteína pVIII con el uso de fagémidos de alta eficiencia de transformación que permite generar repertorios de proteínas recombinantes. Un fagémido es un plásmido híbrido que contiene orígenes de replicación para el ADN de doble cadena y cadena sencilla para el plásmido y el bacteriófago. Además, de un gen de resistencia a antibiótico, el gen III o VIII para la fusión con el péptido de interés, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, un promotor y un segmento de ADN que codifica un péptido señal (Qi et al., 2012). El número de péptidos fusionados es variable, el vector fagémido se convierte a bacteriófago infectivo por una súper infección con bacteriófago ayudador en bacterias que contienen al fagémido. La proteína pVIII recombinante proviene del fagémido y las demás proteínas necesarias para la formación del bacteriófago se encuentra en el genoma del bacteriófago ayudador, el genoma del bacteriófago

ayudador tiene un origen de replicación defectuosa, por lo que se favorece el empaquetamiento de la cadena sencilla del gen pVIII del fagémido. La proteína pVIII madura consta de 50 aminoácidos, su región amino terminal se encuentra expuesta en la superficie cuyos primeros 4-5 residuos de aminoácidos forman un brazo flexible y posteriormente asume una estructura secundaria de alfa-hélices hasta el aminoácido Prolina 6 del extremo carboxilo terminal el cual se une al ADN a través de puentes salinos, el ensamblaje de la cápside ocurre al mismo tiempo que el proceso de estructuración y el empaquetamiento del genoma que se da por pVIII (Makowski, 1994; Rodi et al., 2005; Sioud, 2019). Existen modelos de despliegue en bacteriófagos para la clonación de fragmentos de ADN que codifican el péptido de interés en la proteína III o VIII, sin embargo, el aumento en el número de residuos empleados en la pVIII provoca que se comprometa la función y ensamblaje de la cápside. Por lo tanto, el uso de fagémidos permite generar mejores repertorios de proteínas recombinantes.

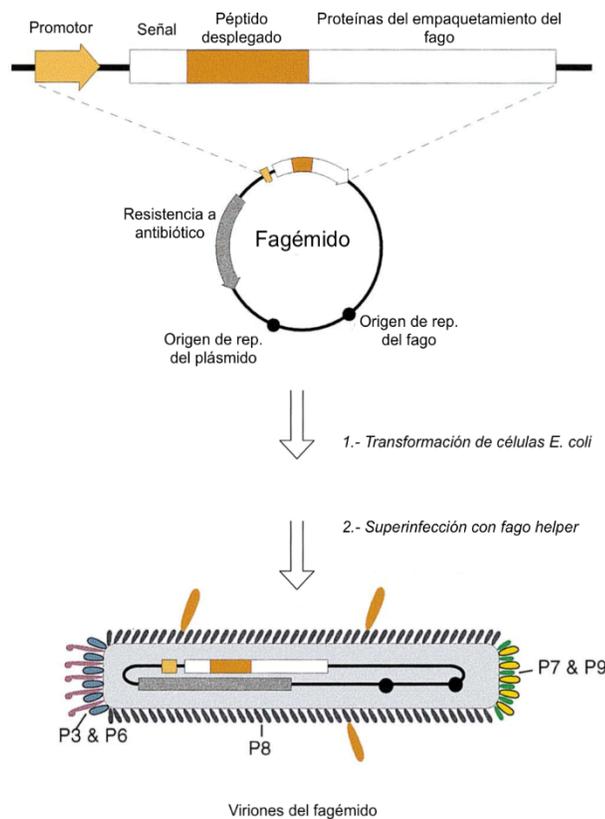


Figura 10. **Despliegue en bacteriófago con vector fagémido.** Un fagémido es un plásmido que contiene orígenes de replicación para el ADN de doble cadena y cadena sencilla para el plásmido y el bacteriófago. Además, de un gen de resistencia a antibiótico, el gen III o VIII para la fusión con el péptido de interés, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, un promotor y un segmento de ADN que codifica un péptido señal (Modificado de Sidhu, 2001; Qi et al., 2012).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muertes que afecta a la población femenina a nivel mundial. A pesar de los avances en los últimos años en el conocimiento de la biología y de los tratamientos de la enfermedad todavía existen problemas que no se han resuelto. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de las vacunas contra el cáncer es la variabilidad genética y/o antigénica de las células tumorales y la propia tolerancia de los antígenos asociados al tumor que conduce al escape inmunitario. Esto se debe a que el panorama de los antígenos en el tumor está en permanente en cambios dinámicos, es decir, en pérdida y ganancia de la expresión de ellos (Anagnostou et al., 2017; Riaz et al., 2017). Además, los mecanismos de tolerancia central y periférica influyen de manera negativa en la generación de una respuesta inmunitaria por los antígenos contenidos en las vacunas (Fennemann et al., 2019). Por lo tanto, la mayoría de los epítomos variables no son reconocidos por las células T en los pacientes con cáncer. Debido a esto cabe preguntarse: ¿la inmunización con las bibliotecas de epítomos variables (BEV) derivadas de OFA/iLRP inducirá una respuesta inmunitaria capaz de reconocer y eliminar a las células neoplásicas en un modelo murino de adenocarcinoma de mama 4T1?

4. HIPÓTESIS

La inmunización con vacunas basadas en BEV derivada de una región multiepitópica de la proteína OFA/iLRP inducirá una respuesta amplia de activación de células T citotóxicas capaces de reconocer no solamente al epítipo silvestre sino también a la mayoría de los epítipos mutados y, por lo tanto, inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis en comparación con la secuencia silvestre.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los inmunógenos basados en BEV derivadas de una región multiepitópica de la proteína OFA/iLRP, que sean capaces de activar una respuesta inmunitaria antitumoral en un modelo murino de adenocarcinoma de mama triple negativo inducido por la línea celular 4T1.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir una biblioteca de epítipos variables de OFA/iLRP a partir de una región multiepitópica, en formato de bacteriófago recombinante M13.
- Evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de los inmunógenos BEV generados en el formato de bacteriófago recombinante M13 y péptido sintético en estudios terapéuticos.
- Caracterizar las propiedades inmunogénicas y antitumorales inducidas por las vacunas BEV de 43 y 9 aminoácidos en un modelo de adenocarcinoma de mama de ratón 4T1 mediante ensayos de inmunofenotipificación, proliferación celular y perfil de citocinas de células T.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Construcción de los inmunógenos

Para la construcción de los inmunógenos se utilizó las secuencias de los epítomos de células T restringidas para el haplotipo H-2Kd que se encuentran dentro de la proteína OFA/iLRP. Estos ya habían sido previamente reportados por Rohrer y colaboradores en 2006. A partir de esto se seleccionó una secuencia multiepitópica de 43 aminoácidos y una secuencia de epítomo de 9 aminoácidos, véase la tabla 4, y se realizó un análisis *in silico* para corroborar la unión a molécula de clase I del MHC (H-2Kd). Cabe señalar que la secuencia de 9 aminoácidos se encuentra dentro de la secuencia de 43 aminoácidos. En el diseño de la biblioteca de epítomos variables se introdujeron mutaciones en las secuencias: 6 mutaciones dentro de la secuencia de 43 aminoácidos y 3 mutaciones dentro de la secuencia de 9 aminoácidos. Los residuos mutados se aleatorizaron, pero se respetaron los sitios de anclaje a la molécula de clase I del MHC. De esta manera, se generaron dos BEV en formato de péptido sintético: BPO-43 y BPO-9 (Tabla 4). Las contrapartes de tipo silvestre (WT) utilizadas para generar las BEV también se generaron como péptidos sintéticos, NPO-43 y NPO-9 (Tabla 4). PGRS es derivado de la proteína de la familia PPE de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), PPE15 se generó como un antígeno de control de BEV no relacionado en formato de péptido sintético y contiene ocho posiciones mutadas aleatoriamente (Tabla 4). Los péptidos fueron sintetizados por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EE. UU.) y Ontores Biotechnologies (Shanghai, China).

Las BEV derivadas de OFA/iLRP mencionados anteriormente y las contrapartes silvestres también se generaron como epítomos variantes expresados como péptidos de fusión en la proteína de envoltura cpVIII del bacteriófago M13. Se utilizaron procedimientos estándar de biología molecular para generar inmunógenos del bacteriófago M13 recombinante (Figura 11), como se describe en nuestros trabajos anteriores (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020). Se utilizaron oligonucleótidos / fragmentos de ADN correspondientes (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para generar los inmunógenos (los tripletes mutados son NNK, N = G, A, T o C y K = G o T) (Tabla 3). Generamos una BEV en formato de bacteriófagos recombinantes M13, BFO-43 y su contraparte WT, NFO-43. La BEV de 9 aminoácidos BFO-9 y su contraparte WT, NFO-9, ya se encontraba construida previamente. Se seleccionaron al azar 32 variantes de BFO-9, se rescataron y secuenciaron para su uso en experimentos de proliferación celular, todos los clones expresaron diferentes variantes de epítomo (Tabla 2). Se usó un epítomo de 9 aminoácidos de CTL derivado de VIH-1, B22, como inmunógeno de control de fago no relacionado, así como G5D, una BEV basado en una secuencia de alanina y

usado como un antígeno de control de BEV no relacionado; ambos han sido descritos previamente (NoeDominguez-Romero et al., 2014).

Tabla 3. Fragmentos y cebadores de ADN de OFA/iLRP utilizados para generar las BEV y sus contrapartes silvestres para el formato de bacteriófago

Inmunógenos derivados de OFA/iLRP	Secuencias de ADN
NFO-43	5'-gtatattactgtgcgattaacctgaaacgcacctgggaa aaactgctgctggcggcgcgcgcg-3' 5'-gctaatcacgctcacatccgccgggtttcaatcgccacaatcgcgcgcgccgag-3' 5'-gtgagcgtgattagcagccgcaacaccggccagcgcggtgctgaaattgctgg-3' 5'-ggttccctggccccacgcaaatttcag-3'
BFO-43	5'-gtatattactgtgcgattaacctgaaacgcnnkgtggnkkaaactggnkctggcggcgcgcgcg-3' 5'-gctaatcacgctcacatccgccgggtttcaatcgccacaatcgcgcgcgccgag-3' 5'-gtgagcgtgattagcagccgcaacnnkggcnnkcgcnkgtgctgaaattgctgg-3' 5'-ggttccctggccccacgcaaatttcag-3'
NFO-9	5'-gtatattactgtgcgaaaagaactgggaaaaattattatggggccaggggaacc-3'
BFO-9	5'-gtatattactgtgcgaaaagannkgtggnkkaaattannkttatggggccaggggaacc-3'
G5D	5'-gtatattactgtgcggcaggtccannknknknknknknknkwtgtggggccaggggaacc-3'
Iniciadores para PCR	Oligonucleótidos
5'DAmp	5'-tgatattcgtactcgagccatggtgtatattactgtgcg-3'
3'DAmp	5'-atgattgacaaagcttgatccctaggtccctggcccca-3'
nnk: n= g, a, t o c y k= g o t. Pares de oligonucleótidos (oligos) que llevan los sitios de restricción Nco I y Bam HI (subrayados en oligos).	

Brevemente, para la construcción de los inmunógenos se realizó un ensamblaje con los oligonucleótidos que codifican para las BEV a una concentración de 25 pmol/reacción, también para sus correspondientes WT, se preparó una mezcla que contenía dNTPs (0.4 mM) con los oligos correspondientes de cada BEV y WT en una solución tamponada DreamTaq 1x (MgCl₂ 2mM) y agua a un volumen final de 25 uL. Posteriormente se realizó la siguiente incubación: 95 °C 30 s, 84 °C 1 min, 74 °C 1 min, 64 °C 1min, 54 °C 1 min, 37 °C 1 min en un termociclador (Corbett research) y 5 min en hielo de agua. Se adiciono 1.5 U de la enzima DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Scientific) y se realizaron las siguientes incubaciones: 94 °C 7 min, 7 ciclos de 95 °C 1.3 min, 54 °C 2 min, 72 °C 2 min y finalmente 72 °C 2 min, 4 °C 1 min en el termociclador (Corbett research). El ADN producto del ensamblaje fue amplificado por PCR con iniciadores complementarios a las regiones extremo de las BEV y WT que flanquean el epítipo/péptido y que introducen sitios de restricción Nco I/Bam HI, necesarios para la clonación en el vector fagémido pG8SAET (Tabla 3 y Figura 11). Se tomó 1 µL (1 ng de dsADN) y se adicionó a una mezcla que contenía dNTPs (0.4 mM), los iniciadores 5'DAMP y 3'DAMP, solución tamponada DreamTaq 1x (MgCl₂ 2mM) y 3 U de la enzima DreamTaq DNA

polimerasa (Thermo scientific) en un volumen final de 25 μ L y se realizó la siguiente incubación: 95 °C 3 min y 20 ciclos de 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s y 72 °C 3 min, 4 °C 1 min. Posteriormente, los productos de la amplificación fueron verificados en un gel de agarosa al 2 % y purificados por el kit (Wizard SV Gel and PCR Clean Up System, Promega). Se digirieron las muestras de ADN con las enzimas de restricción Nco I y Bam HI, se utilizaron 30 U de la enzima Bam HI (Fermentas) durante 1 h a 37 °C en solución tamponada Tango 1x. Posteriormente se inactivó la enzima a 80 °C durante 20 min. Se incubó con 30 U de la enzima Nco I (New england Biolabs) durante 1 h a 37 °C en solución tamponada NEB 3.3. Luego se inactivó la enzima durante 20 min a 65 °C. El ADN doble digerido se purificó con el kit (Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System de Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de las digestiones fueron verificados en geles de agarosa. En las reacciones de ligación del vector con el inserto se empleó una relación 1:1. Se incubó toda la noche a 4 °C con 9 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) en solución tamponada Ligasa 1x (Promega). Los productos de la ligación se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator TM-5, ZYMO RESEARCH. Luego se realizó la electroporación de todas las muestras de ADN de las ligaciones en la cepa TG1 de *E. coli* con un Electroporador Gene Pulser II de Biorad (Figura 11). Después de la electroporación, esta cepa se sembró en placas de LB agar/Amp para determinar el número de transformantes, posteriormente se realizaron PCR de colonia para verificar la correcta clonación. Las demás alícuotas de células transformantes se congelaron a -70 °C y una se utilizó para la purificación y rescate con bacteriófago helper M13K07. Para determinar el título de la biblioteca de bacteriófagos, células *E. coli* TG1 fueron infectadas con los bacteriófagos (Manoutcharia, 2005; Pedroza et al., 2009).

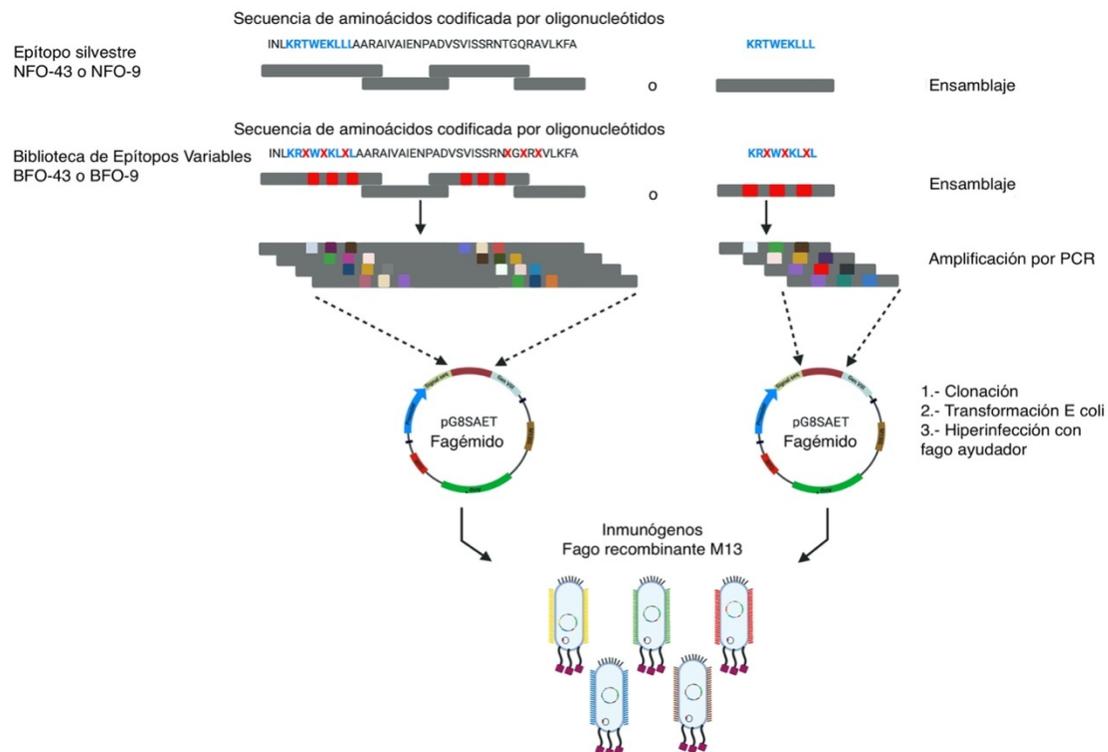


Figura 11. **Generación de inmunógenos bibliotecas de epítomos variables.** Se usaron 4 oligonucleótidos que se traslapan, ensamblan y codifican para la BEV de 43 aminoácidos y 1 oligonucleótido para la BEV de 9 aminoácidos, de la misma forma los oligonucleótidos de sus contrapartes silvestres. Se realizó un ensamblaje con los oligonucleótidos. Luego se realizó la amplificación de PCR con iniciadores 5'Damp y 3'Damp que introducen los sitios de restricción para Bam HI y Nco I para después realizar la digestión con las enzimas de restricción correspondiente. Posteriormente se realizó la ligación Inserto-vector, todas las muestras de ADN de las ligaciones se clonaron en el vector fagémido pG8SAET. Luego se realizó la electroporación de las muestras de ADN de las ligaciones en la cepa TG1 de *E. coli*. Una alícuota de *E. coli* transformante se utilizó para la purificación y rescate con bacteriófago ayudador M13K07 para generar las bibliotecas en bacteriófago recombinante que se utilizaron como inmunógenos (Manoutcharia, 2005; NoeDominguez-Romero et al., 2014).

7.2 Titulación de bacteriófago filamentoso

Se realizaron 4 diluciones seriadas, en las primeras tres la dilución fue de 1/1000 y en la última fue de 1/10. De la tercera y cuarta dilución se tomaron 3 μL y se infectaron 200 μL de cultivo de bacterias *E. coli* TG1 en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600} = 0,7$). Se incubó a 37 °C durante 40 min en reposo. Se sembró en medio sólido LB agar. Se incubaron las placas a 37 °C durante toda la noche. Se determinó las unidades formadoras de colonias/ μL (ufc/ μL) con el número de las colonias individuales crecidas en el medio de cultivo LB agar.

7.3 Rescate y purificación de bacteriófago filamentoso

Las alícuotas de *E. coli* transformadas de las BEV y WT se incubaron en medio 2xYT con carbenicilina (CB) (50 µg/ml) toda la noche; se realizó un subcultivo 1/100 del anterior y se colocaron en tubos con medio 2xYT y CB (50 µg/ml) se incubaron hasta una D.O. de 0.7 nm. Se colocaron en tubos de 50 ml para la infección con bacteriófago ayudador (Helper Phage M13K07) y se incubaron 30 min a 37 °C sin agitar y otros 30 min con agitación. Pasado este tiempo se transfirieron a matraces con 500 ml de medio 2xYT con Carbenicilina (CB) (50 µg/ml) y Kanamicina (Km) (50 µg/ml); estos matraces se dejaron toda la noche 18 – 20 horas en agitación a 37 °C. Al día siguiente se centrifugó el cultivo 8000 rpm 20 min 4 °C y el sobrenadante se colocó en tubos de polipropileno de 250 ml, se agregó 1/6 parte de polietilenglicol y cloruro de sodio (PEG/NaCl) y se incubó toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó 10 000 rpm 10 min 4 °C y el precipitado se resuspendió en 5 ml de amortiguador salino de tris (TBS); esta suspensión fue colocada en tubos de polipropileno de 50 ml y se agregó 1/5 parte de PEG/NaCl y se incubó toda la noche a 4 °C. Pasado el tiempo se centrifugó 10 000 rpm 15 min 4 °C y se resuspendió el precipitado en 4 ml de TBS, se volvió a centrifugar 3 000 rpm 5 min esta vez para eliminar bacterias residuales, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo estéril y se guardó a 4 °C para realizar su titulación.

7.4 Material biológico

Los ratones hembra BALB/c de 4 a 6 semanas de edad fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo el protocolo (ID:97) aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se sacrificaron mediante una cámara de CO₂. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento durante los experimentos.

7.5 Línea celular 4T1

Las células 4T1 (American Type Culture Collection) se mantuvieron en medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y fungizona (0,75 mg/ml), y se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C 5 % CO₂. Los tumores se implantaron inyectando subcutáneamente (s.c.) 10⁴ células 4T1 viables en 60 µL de solución tamponada con fosfato (PBS) en la almohadilla de grasa mamaria derecha. Los tumores primarios fueron detectables alrededor del día 9 postimplante. Se tomaron medidas del crecimiento tumoral cada 3 días y se calculó el área del tumor como largo (mm) x ancho (mm) usando un Vernier digital. El criterio de punto final del experimento se estableció como el día 30 después del implante tumoral.

7.6 Tratamiento terapéutico con los inmunógenos BEV y WT

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 5 a 6 semanas de edad en grupos de 5-8 individuos. Todos los experimentos se repitieron al menos cuatro veces con resultados comparables. Las inmunizaciones se realizaron al día 5 postimplante por la vía de administración s.c. de 180 µg de péptido sintético más 180 µg de adyuvante de ácido polinosínico: policitidílico (Poly (I: C), Sigma-Aldrich) en 100 µL de PBS. Los inmunógenos de bacteriófagos se administraron por vía intravenosa (i.v.) 1×10^{12} partículas de bacteriófagos suspendidas en 200 µL de PBS. Los grupos control (antígeno no relacionado) recibieron la misma dosis de péptido sintético o bacteriófago recombinante. Todos los animales recibieron una dosis única de un inmunógeno. Las metástasis pulmonares se analizaron por conteo de las lesiones macrometastásicas al día 30 después del reto tumoral, se utilizó el fijador Bouin como disolución de contraste entre el tejido normal (amarillo) y la metástasis (blanco) al perfundir los pulmones.

7.7 Ensayo de proliferación celular y citometría de flujo

Se realizaron diferentes condiciones experimentales para evaluar la inmunogenicidad y especificidad de las respuestas inmunes inducidas por las BEV. En el tratamiento de solo inmunización, se recolectaron los esplenocitos de ratones que no portaban tumores al día 75 después de la inmunización. En el tratamiento profiláctico, a los ratones se les implantaron células 4T1 60 días después de la inmunización y los esplenocitos se obtuvieron el día 15 después del implante tumoral. En el tratamiento terapéutico, los ratones se inmunizaron el día 5 después del implante tumoral y los esplenocitos se obtuvieron el día 15 postimplante. Se utilizaron esplenocitos de los grupos control para explorar las respuestas inmunitarias naturales utilizando ratones intactos y ratones expuestos a células 4T1; estos últimos se obtuvieron el día 15 después del implante tumoral (Figura 12).

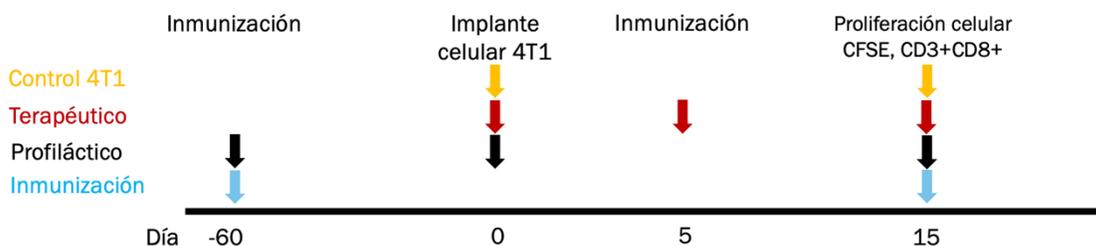


Figura 12. Esquema experimental de los tratamientos en los ensayos de proliferación celular.

Los esplenocitos provienen de 3 ratones por grupo y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando protocolos estándar como se describe en nuestros estudios anteriores (Servín-Blanco et al., 2018; Domínguez-Romero et al., 2020). Brevemente, las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 % y 2-beta-mercaptoetanol al 1 %, luego se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron nuevamente en RPMI-1640 a una concentración de 5×10^7 células/mL. Las células se tiñeron con CFSE 1,2 μM (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, luego se lavaron dos veces con 10 mL de PBS/FBS al 5 % 4 °C. Posteriormente los esplenocitos se cultivaron en una placa de fondo plano de 96 pozos ($2,5 \times 10^5$ células/pozo). Las células se estimularon con 3×10^9 partículas de bacteriófagos recombinantes/porozo, correspondientes a las variantes de BFO-9 durante 72 hr 37 °C y 5 % CO_2 en una incubadora humidificada. El marcaje de los antígenos de superficie se llevó a cabo usando anti-CD3 APC-eFluor780 (clon 145-2C11, ThermoFisher Scientific) y anti-CD8 PE (clon 53-6.7) (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) en 1 % FBS/PBS por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, luego las células se fijaron con paraformaldehído al 1 %. Las células muertas fueron excluidas por 7-aminoactinomicina D (Tonbo Biosciences). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune (ThermoFisher, Waltham, MA, EE. UU.) y los resultados se analizaron utilizando la prueba gratuita FlowJo (BD, San José, CA, EE. UU.); se adquirieron al menos 100 000 eventos en total. La estrategia representativa del análisis para la proliferación de células T CD8+ con CFSE en figura suplementaria E.

Para evaluar las respuestas de células T CD4+IFN- γ + y CD8+IFN- γ + *in vitro*, se inmunizaron ratones con péptido sintético correspondiente a las BEV y sus contrapartes WT el día 5 después del implante tumoral, y se obtuvieron los esplenocitos el día 15 postimplante. Se estimularon los esplenocitos con 3×10^9 partículas de bacteriófagos recombinantes por pozo correspondientes a las BEV, y sus contrapartes WT y controles durante 72 h 37 °C y 5 % CO_2 en una incubadora humidificada. Durante las últimas 5 h de incubación, las células se trataron con monensina 1 μL /pozo (2 μM) (Sigma-Aldrich). La tinción de los antígenos de superficie se llevó a cabo utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD3 APC-eFluor780 (clon 145-2C11, ThermoFisher Scientific), anti-CD4 APC (clon RM4-5, ThermoFisher Scientific) y anti-CD8 PE (clon 53-6.7, BioLegend) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 1 % durante 15 min a temperatura ambiente y luego se lavaron. Después de la permeabilización con la solución tampón de permeabilización (Tonbo), se añadió anti-IFN- γ PE-Cy7 (clon XMG1.2, BioLegend) y se incubó durante 30 min en la oscuridad. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune (ThermoFisher) y los resultados se analizaron utilizando la prueba gratuita FlowJo (BD); se adquirieron al menos 100 000 eventos en total. La estrategia representativa del análisis para la identificación de células T CD8+ y CD4+ productoras de IFN- γ en figura suplementaria D.

7.8 Inmunofenotipificación por citometría de flujo en tratamientos terapéuticos

Se utilizaron marcadores de inmunofenotipo celular para analizar las poblaciones de células T CD3+CD8+IFN- γ +, CD3+CD8+Ly6C+, CD8+GranzimaB+, CD8+Perforina+ y CD4+CD25+FoxP3+. Además, de la población de células supresoras derivadas mieloides granulocíticas (G-MDSC) CD11b+Ly6ClowLy6G+. Se mezclaron 3 órganos por cada tipo: bazos, pulmones y tumores de 3 ratones inmunizados el día 30 postimplante para preparar suspensiones celulares. Se tiñeron $2,5 \times 10^5$ células/pozo de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un panel de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia: anti-CD3 APC-eFluor780 (clon 145-2C11, ThermoFisher Scientific), anti-CD8 PE (clon 53-6.7, BioLegend), anti-Ly6C PE-Cy7 (clon HK1.4, ThermoFisher Scientific), anti-IFN- γ PE-Cy7 (clon XMG1.2, BioLegend), anti-IFN- γ PerCP-Cy5.5 (clon XMG1.2, BioLegend), anti-Granzima B FITC (clon NGZB, ThermoFisher Scientific), anti-Perforina APC (clon S16009A, BioLegend), anti-CD11b AlexaFluor488 (clon M1/70, BioLegend), anti-Ly6G PE (clon RB6-8C5, ThermoFisher Scientific), anti-CD3 PE-Cy7 (clon 145-2C11, Tonbo Biosciences), anti-CD4 APC (clon RM4-5, BioLegend), anti-CD25 APC-eFluor780 (clon PC61.5, ThermoFisher Scientific), anti-FoxP3 PE (clon 3G3, ThermoFisher Scientific). Se utilizó Ghost Dye Violet 450 o 7AAD como colorantes de viabilidad. Para la tinción intracelular, las células se trataron con monensina 1 μ L/pozo (2 μ M) (Sigma-Aldrich) durante al menos 4 h. Las células se tiñeron primero para los antígenos de superficie con los anticuerpos monoclonales correspondientes, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 15 min a temperatura ambiente y luego se permeabilizaron con la solución tampón de permeabilización (Tonbo) antes de la tinción intracelular. La tinción de Foxp3 se realizó con Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit (Tonbo Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune (ThermoFisher) y los resultados se analizaron mediante la prueba gratuita FlowJo (BD). La estrategia representativa del análisis para la identificación de células T efectoras CD8+Ly6C+, células G-MDSC CD11b+Ly6ClowLy6G+ y células Treg en las figuras suplementarias F, G, H.

7.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Las curvas de crecimiento tumoral se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples ($n = 10$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Todos los resultados se expresan como media \pm SEM. Los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados comparables. Antes de los análisis estadísticos, los datos de las lesiones metastásicas pulmonares se convirtieron en forma logarítmica para obtener una

distribución normal; Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos del ensayo de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN- γ (%) se analizaron con un ANOVA de dos vías para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos del análisis de citometría de flujo se normalizaron con el número de células/gramo de tejido. El número de células/gramo de tejido de los ratones implantados con células 4T1 sin tratamiento (control 4T1) se consideraron de referencia y se calcularon los cambios de X o *fold change* a partir de éstos. Los datos se expresan como veces de cambio con respecto al control 4T1 como la media \pm DE, n = 4. Las diferencias se consideraron significativas * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

8. RESULTADOS

8.1 Construcción de los inmunógenos

Para la construcción de los inmunógenos BEV en formato de bacteriófago recombinante M13, se diseñaron oligonucleótidos los cuales codifican para la BEV de 43 aminoácidos multiepitópica con 6 mutaciones (BFO-43) y otra de 9 aminoácidos con 3 mutaciones (BFO-9), además de sus respectivas contrapartes silvestres (WT), NFO-43 y NFO-9 (Tabla 4). Las complejidades calculadas de las bibliotecas de bacteriófagos fueron 55 500 clones individuales para BFO-43 y 8 505 clones individuales para BFO-9. La biblioteca de 9 aminoácidos BFO-9 y su contraparte WT, NFO-9, ya se encontraba construida previamente.

Los ensamblajes de ADN correspondientes a las BEV y los WT (mostrados en materiales y métodos, Tabla 3) se amplificaron por PCR y se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes para ser clonados en el vector fagémido pG8SAET con unión al gen que codifica para la proteína cpVIII del bacteriófago. Los aminoácidos del sitio de anclaje (2 y 9) que sirven de unión a las moléculas de clase I del MHC (haplotipo H- 2Kd) se mantuvieron intactos dentro de los epítomos para la biblioteca de 43 y 9 aminoácidos, mientras que los aminoácidos responsables en la interacción con el TCR tienen aminoácidos al azar en tres posiciones dentro del epítomo señalado con X. En la figura 11, se ilustra la construcción de los ensamblajes hasta la clonación en el vector fagémido.

Tabla 4. Secuencias de Inmunógenos			
Formato			
Secuencia silvestre (WT)	Bacteriófago recombinante	Péptido sintético	Secuencias de aminoácidos
	NFO-43	NPO-43	INLKRTWEKLLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFA
	NFO-9	NPO-9	KRTWEKLLL
Biblioteca de Epítomos Variables (BEV)	BFO-43	BPO-43	INLKRXWXKLXLAARAIVAIENPADVSVISSRNXGXRXLKFA ^a
	BFO-9	BPO-9	KRXWXKLXL ^a
	-----	PGRS	LFXNGGAGGQGGXGGXGGXGGXGGXGMAXGPAGGTGGIGXIGGIG ^{a, b}
	G5D	-----	A(G/F)PXXXXX(L/M) ^{a, d}
Epítomo	B22	-----	ALQRLFETC ^c

^a X – cualquiera de los 20 aminoácidos naturales.

^b BEV derivado de Mtb, utilizado como inmunógeno no relacionado.

^c Epítomo derivado del VIH-1, utilizado como inmunógeno no relacionado.

^d BEV utilizado como antígeno no relacionado.

Las BEV derivadas de OFA/iLRP mencionadas arriba y sus contrapartes WT, también se utilizaron en otro formato alternativo de inmunógeno, que fue el uso de péptido sintético (BPO-43 y BPO-9), además de sus contrapartes silvestres (NPO-43 y NPO-9). Para el formato de péptido sintético las complejidades del repertorio teórico para las BEV fueron de 64×10^6 variantes individuales para BPO-43 y 8×10^3 variantes individuales para BPO-9, respectivamente. También, se utilizó un antígeno como control de BEV no relacionado en formato de péptido sintético PGRS derivado *Mycobacterium tuberculosis*.

El análisis del panel BFO-9 Ag (Tabla 2) muestra que están presentes 13 -16 aminoácidos diferentes en las posiciones mutadas de las 32 variantes de epítomos, lo que indica la distribución aceptable de las mutaciones introducidas y, por lo tanto, de la diversidad de los epítomos de la biblioteca como sea observado en nuestros estudios anteriores (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020).

Tabla 2

Secuencias de variantes del epítomo silvestre derivadas del Ag OFA / iLRP

Epítomo silvestre	K	R	T	W	E	K	L	L	L
Biblioteca de epítomos	K	R	X	W	X	K	L	X	L
Variantes del epítomo									
1	-	-	C	-	F	-	-	F	-
2	-	-	P	-	L	-	-	P	-
3	-	-	P	-	P	-	-	L	-
4	-	-	K	-	E	-	-	K	-
5	-	-	Q	-	R	-	-	I	-
6	-	-	A	-	N	-	-	A	-
7	-	-	W	-	I	-	-	S	-
8	-	-	K	-	K	-	-	K	-
9	-	-	T	-	P	-	-	P	-
10	-	-	R	-	Q	-	-	H	-
11	-	-	Q	-	K	-	-	K	-
12	-	-	S	-	E	-	-	Y	-
13	-	-	L	-	E	-	-	R	-
14	-	-	Q	-	E	-	-	N	-
15	-	-	R	-	P	-	-	G	-
16	-	-	Q	-	Q	-	-	L	-
17	-	-	E	-	G	-	-	N	-
18	-	-	R	-	E	-	-	E	-
19	-	-	R	-	P	-	-	Q	-
20	-	-	S	-	A	-	-	A	-
21	-	-	C	-	G	-	-	I	-
22	-	-	P	-	T	-	-	Q	-
23	-	-	V	-	F	-	-	V	-
24	-	-	V	-	F	-	-	F	-
25	-	-	E	-	Q	-	-	G	-
26	-	-	G	-	K	-	-	T	-
27	-	-	K	-	H	-	-	K	-
28	-	-	V	-	F	-	-	F	-
29	-	-	W	-	K	-	-	Y	-
30	-	-	P	-	P	-	-	P	-
31	-	-	K	-	G	-	-	Q	-
32	-	-	L	-	G	-	-	Q	-
Frecuencia de aminoácidos			13/32		13/32			16/32	

X - cualquiera de los 20 aminoácidos naturales

8.2 Efecto antitumoral en los ratones vacunados con las BEV

Una vez obtenidos los inmunógenos BEV y sus contrapartes silvestres, se realizaron estudios de vacunación terapéutica para evaluar su efecto antitumoral en el modelo murino de adenocarcinoma de mama 4T1. Se formaron grupos de ratones hembra BALB/c que se implantaron con la línea celular 4T1 de cáncer de mama, una línea celular poco inmunogénica y metastásica. Al día 5 postimplante los ratones se inmunizaron con los inmunógenos BPO-43, BPO-9, NPO-43, NPO-9, Poly I:C (solo adyuvante) y un Ag no relacionado (PGRS) en formato de péptido sintético (Véase la Tabla 4) y administrados por la vía s.c. En los experimentos subsiguientes, los grupos de ratones se inmunizaron con los inmunógenos BFO-43, BFO-9, NFO-43, NFO-9 y un Ag no relacionado (B22) en formato de bacteriófago recombinante M13 (Véase la Tabla 4) y administrados por vía i.v. El área tumoral se midió hasta 30 días posteriores a la implantación. En la figura 13, se muestra el esquema de vacunación correspondiente para cada grupo de ratones; también se utilizó un grupo de ratones control 4T1 que solo tiene implante de células 4T1.

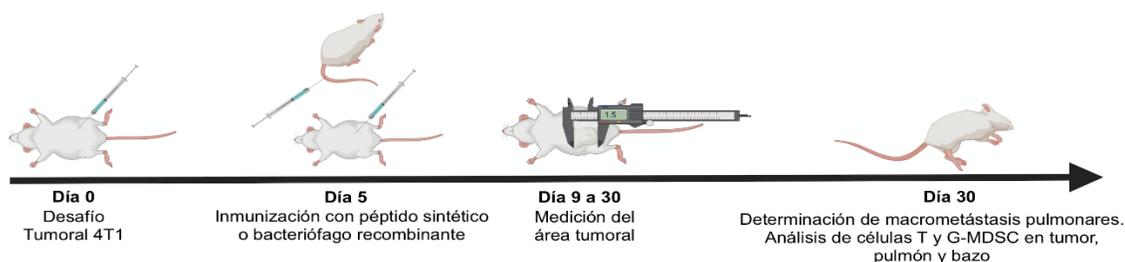


Figura 13. **Esquema de inmunización terapéutica.**

El tratamiento con los inmunógenos BEV en formato de péptido sintético resultó en una reducción del crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con los grupos control, es decir, la inmunización con la BEV BPO-43 inhibió el crecimiento del tumor cuando fue comparado con los grupos control Ag no relacionado, Poly I:C y el control 4T1 (Figura 14A). Similar efecto de inhibición de crecimiento tumoral fue observado en el tratamiento con la BEV BPO-9 en comparación con los grupos control y su contraparte WT NPO-9 (Figura 14B). Debido a que el modelo murino de adenocarcinoma de mama 4T1 hace metástasis espontánea en los pulmones, los ratones se sacrificaron al día 30 postimplante y se extrajeron los pulmones y se contaron las macrometástasis que se encontraban en la superficie de los órganos (Figura 14C). Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de las lesiones metastásicas en los pulmones de ratones vacunados con la biblioteca BPO-43 cuando fue comparado con los grupos control 4T1, Poly I:C y la contraparte WT NPO-9 (Figura 14C y figura suplementaria B). La BEV BPO-9 solo presentó disminución estadísticamente significativa de las macrometástasis pulmonares cuando fue comparado con el grupo control 4T1, como se muestra en la figura 14C.

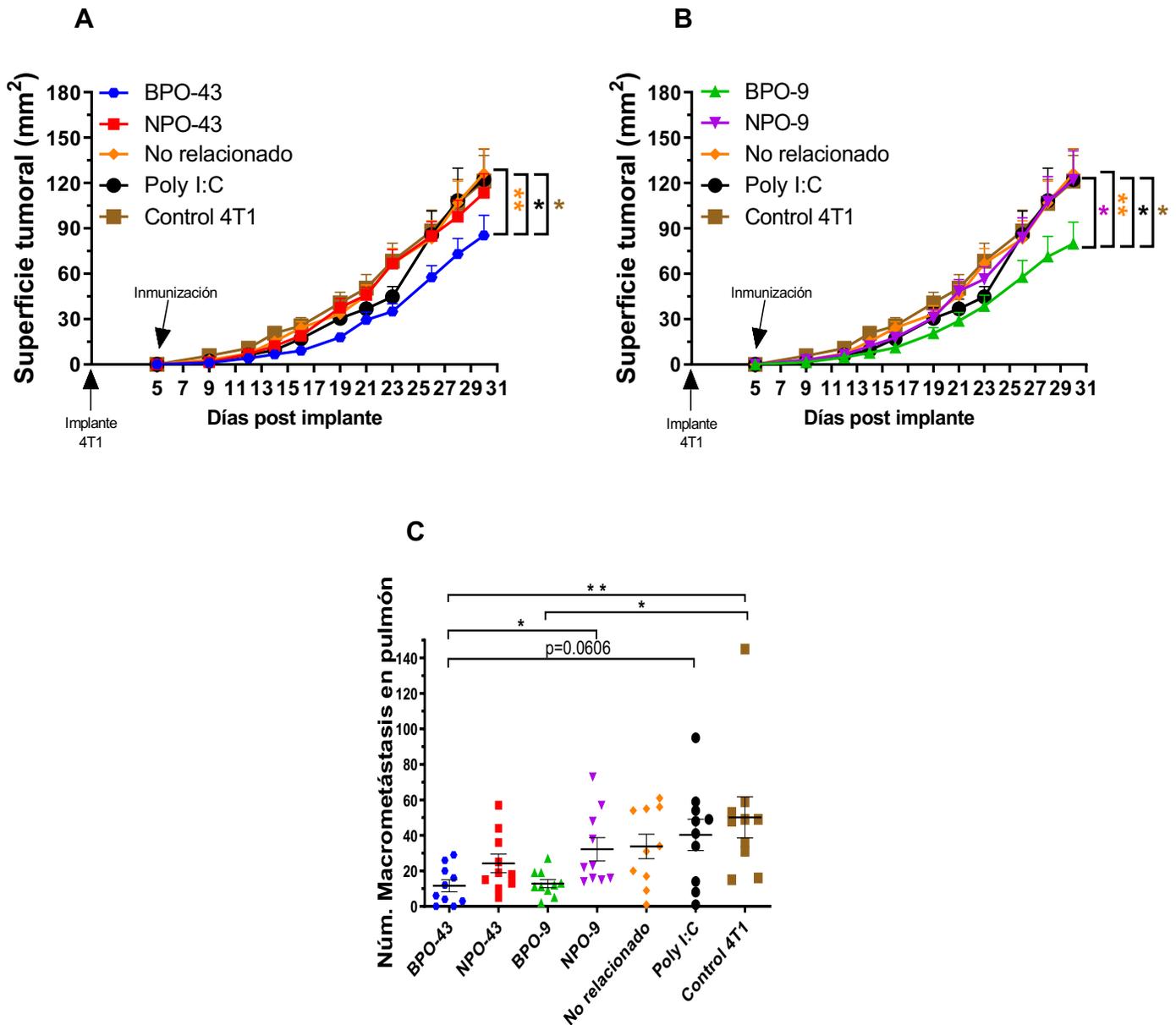


Figura 14. **Evaluación del efecto antitumoral en tratamiento terapéutico.** Crecimiento tumoral de ratones tratados con las bibliotecas A) BPO-43 y B) BPO-9 en formato de péptido sintético. Ratones hembra de 5 a 6 semanas de edad se implantaron con 10000 células de la línea celular 4T1 en la glándula mamaria derecha, al día 5 postimplante se inmunizaron vía subcutánea con 180 μ g de péptido sintético más 180 μ g del adyuvante Poly I:C. El área tumoral y la macrometástasis se midió hasta el día 30 postimplante y se muestra la media \pm SEM; n = 10; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. El área del tumor se analizó al usar una ANOVA de dos vías para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. C) Efecto del tratamiento con las BEV BPO-43 y BPO-9 en el número de las macrometástasis en los pulmones, las macrometástasis se evaluaron al día 30 postimplante. Los ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones y se contaron las lesiones metastásicas en la superficie de los pulmones. Las macrometástasis se analizaron al realizar una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Grupo no relacionado (PGRS).

El tratamiento con los inmunógenos BEV en formato de bacteriófago recombinante M13 resultó en una reducción del crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con los grupos control, es decir, la inmunización con la BEV BFO-43 inhibió el crecimiento del tumor cuando se comparó con el grupo control Ag no relacionado y su contraparte WT NFO-43 (Figura 15A). El mismo efecto de inhibición del crecimiento tumoral se observó en el tratamiento con la BEV BFO-9 en comparación con el grupo control Ag no relacionado y su contraparte WT NFO-9 (Figura 15B). Como seguimiento, analizamos la carga metastásica en los pulmones, encontramos una reducción estadísticamente significativa en los ratones tratados con la BEV BFO-9 cuando se comparó con los grupos control Ag no relacionado, control 4T1 y su contraparte WT NFO-9 (Figura 15C y figura suplementaria B). Además, cuando comparamos los grupos de tratamientos BFO-43 y BFO-9, observamos una reducción significativa de las macrometástasis en los ratones tratados con BFO-9 (media 14 vs 32 lesiones metastásicas); sorprendentemente, esto no se observó cuando se utilizó el formato de péptido sintético BPO-43 frente a BPO-9 (media 12 vs 13 lesiones metastásicas), pero ambos BEV alcanzaron niveles similares de reducción de las metástasis (Figura 14C). En conjunto, estos resultados demuestran la relevancia de las vacunas BEV en términos de la inhibición de los tumores y las metástasis en los pulmones.

Además, se analizaron los pesos de los tumores, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, observamos una tendencia hacia la reducción del peso del tumor entre los ratones tratados con las BEV (Formato péptido sintético BPO-43 media 0.74 g y BPO-9 0.62 g; formato bacteriófago recombinante BFO-43 media 0.97 g y BFO-9 0.87 g) y sus contrapartes silvestres (Formato péptido sintético NPO-43 media 1.01 g y NPO-9 0.87 g; formato bacteriogafo recombinante NFO-43 media 1.08 g y NFO-9 1.04 g) (Figura suplementaria A), lo que refleja los datos obtenidos de la reducción del crecimiento tumoral.

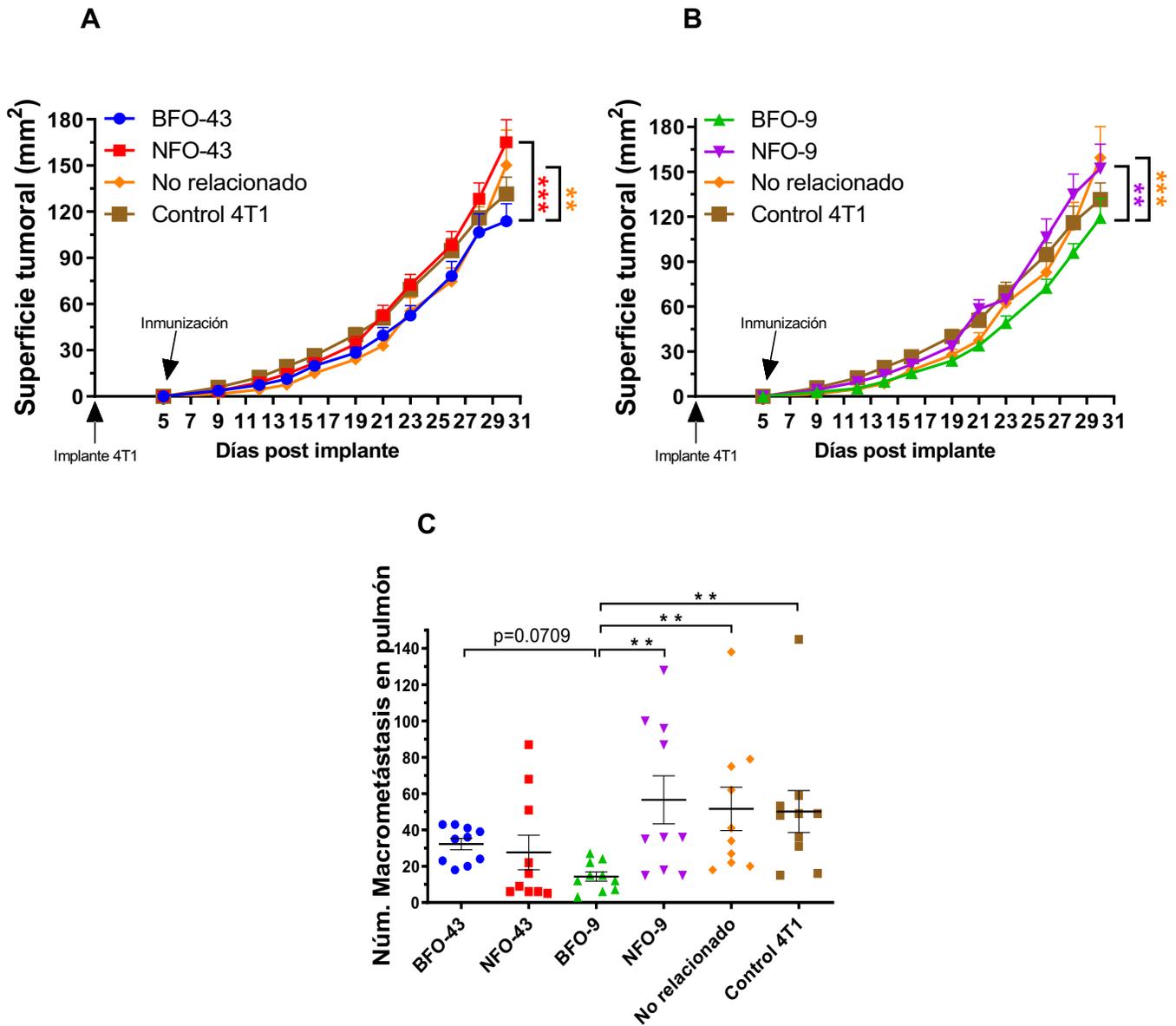


Figura 15. **Evaluación del efecto antitumoral en tratamiento terapéutico.** Crecimiento tumoral de ratones tratados con la biblioteca A) BFO-43 B) BFO-9 en formato de bacteriófago recombinante. Ratones hembra de 5 a 6 semanas de edad se implantaron con 10000 células de la línea celular 4T1 en la glándula mamaria derecha, al día 5 postimplante se inmunizaron vía intravenosa con 1×10^{12} bacteriófagos recombinante. El área tumoral y la macrometástasis se midió hasta el día 30 postimplante y se muestra la media \pm SEM; $n = 10$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. El área del tumor se analizó al usar una ANOVA de dos vías para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. C) Efecto del tratamiento con las BEV BFO-43 y BFO-9 en el número de las macrometástasis en los pulmones, la macrometástasis se evaluaron al día 30 postimplante, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones y se contaron las lesiones metastásicas en la superficie de los pulmones. Las macrometástasis se analizaron al realizar una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Grupo no relacionado (B22).

8.3 Respuesta inmunitaria celular inducida por las BEV

Para investigar si los efectos terapéuticos observados inducidos por inmunógenos BEV estaban mediados por respuestas inmunitarias celulares, se determinó la presencia de las células T CD8+ y CD4+ productoras de IFN- γ Ag específico en los bazo de los ratones inmunizados. Para examinar esto, se estimularon los esplenocitos de los ratones tratados con las BEV y sus contrapartes WT *in vitro* con los inmunógenos en formato de bacteriófago recombinante. Como se muestra en la figura 16A y B, se detectaron porcentajes más altos de células T productoras de IFN- γ al estimular los esplenocitos de los ratones inmunizados con BPO-9 con los antígenos BEV BFO-43 y BFO-9, mientras que las células de los ratones vacunados con NPO-9 mostraron una respuesta mínima a la estimulación del antígeno. Por el contrario, no se observaron diferencias en el porcentaje de las células CD8+IFN- γ + obtenidas de los grupos inmunizados con BPO-43 y NPO-43 (Figura 16).

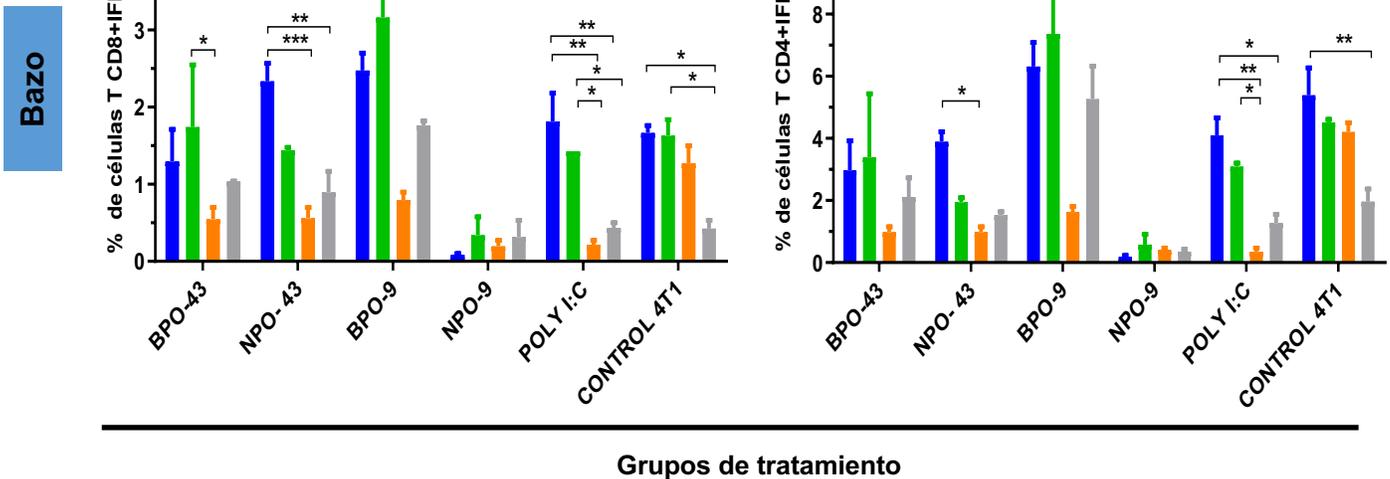


Figura 16. **Respuestas inmunitarias celulares inducidas por las BEV.** Ensayo de células T CD8+ y CD4+ productoras de IFN- γ en ratones portadores de tumor inmunizados con las BEV derivados de OFA/iLRP y estimulados *in vitro* con los Ags en formato de bacteriófagos: BFO-43, BFO-9 y G5D (Inmunógeno no relacionado). Los ratones se inmunizaron al día 5 postimplante y los esplenocitos se obtuvieron al día 15 postimplante. Los resultados (%) de las células CD8+ y CD4+ productoras de IFN- γ provienen de las células CD3+ totales. Cada punto representa a las células de tres ratones diferentes. Se llevaron a cabo al menos 3 experimentos independientes. El % de células IFN- γ + se presentan como la media \pm SEM y se analizaron al realizar una ANOVA de dos vías para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

En consecuencia, decidimos ampliar las respuestas inmunitarias inducidas durante la terapia con BPO-9. Por lo tanto, se tomaron 24 clones de bacteriófagos variantes de la biblioteca de epítomos de BFO-9 de la selección anterior (Tabla 2) y se cultivaron con las células T CD8+ obtenidas de los bazo de los ratones portadores y no portadores de tumor inmunizados con BPO-9 o su contraparte WT, NPO-9. Realizamos un experimento de profilaxis a largo plazo (Figura 17B; desafío tumoral 60 días después de la inmunización) para determinar los perfiles inmunogénicos en los ratones desafiados con los tumores versus no desafiados (Figura 17A), ambos inmunizados con BPO-9 o NPO-9.

Encontramos una mayor inmunogenicidad con la BEV en comparación con la inmunización con el epítomo silvestre, es decir, el 80 % de las variantes del epítomo fueron reconocidas por las células T CD8+ del grupo inmunizado con BPO-9, mientras que solo el 20 % de las variantes fueron reconocidas por las células de los ratones inmunizados con NPO-9 (Figura 17A). A pesar de la disminución de la proliferación de las células T CD8+ provenientes de ratones retados con el tumor en el tratamiento profiláctico, debido a la fuerte inhibición inducida por el tumor, se observó una tendencia similar, es decir, un reconocimiento preferencial de las variantes por las células T CD8+ derivadas de los ratones inmunizados con BPO-9 en comparación con ratones inmunizados con NPO-9 (Figura 17B). En el tratamiento terapéutico, se observó que el 65 % de las variantes probadas indujeron la proliferación de las células T CD8+ en los esplenocitos provenientes de los ratones tratados con BPO-9, en comparación con el 35 % en las muestras de los ratones tratados con NPO-9 y, curiosamente, varias de las variantes proliferaron mejor al estimular a las células T CD8+ de los ratones tratados con NPO-9 que las de los ratones tratados con BPO-9 (Figura 17C). Estos resultados indican en general la mayor inmunogenicidad de las BEV sobre sus contrapartes WT, en general sobre epítomos de 9 aminoácidos, lo que coincide con nuestros reportes previos (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020). Finalmente, exploramos las respuestas inmunitarias naturales en los ratones intactos y después del inicio de la enfermedad, para evaluar los cambios en el perfil del reconocimiento de los epítomos al utilizar el mismo panel de las variantes del epítomo. Descubrimos que 15 variantes estimulaban preferentemente a las células T CD8+ provenientes de los ratones expuestos a los tumores (control 4T1), 8 inducían una proliferación mayor de las células T CD8+ obtenidas de los ratones intactos en comparación con el grupo de los ratones inoculados con las células 4T1 (Figura 17D). El antígeno NFO-9 igualmente estimuló a las células T CD8+ de ambos grupos.

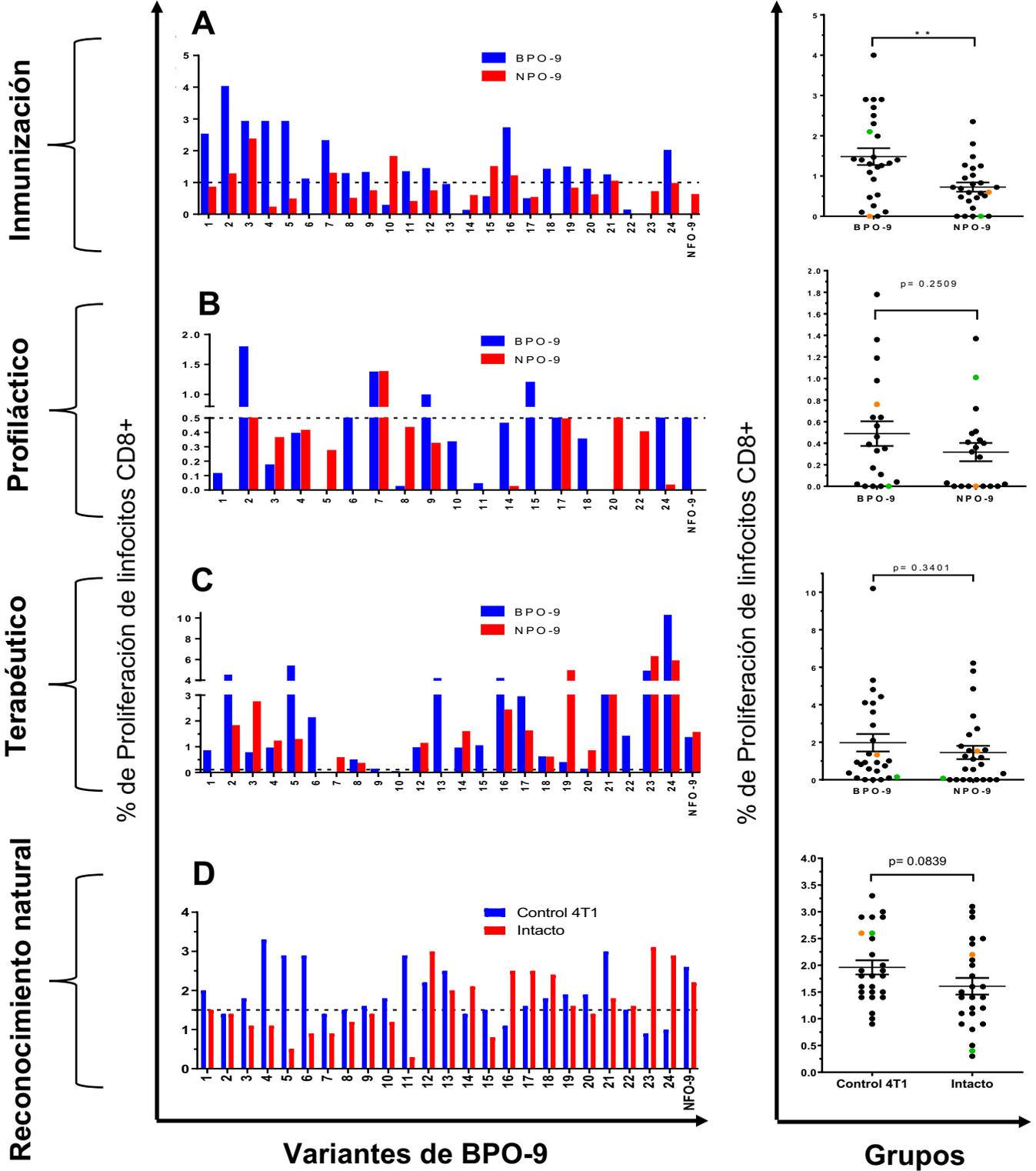


Figura 17. Proliferación de las células T CD8+ específicas por las variantes del epítipo. Se utilizó un panel de 24 variantes del epítipo presentados en bacteriófagos seleccionadas al azar de BFO-9 que se emplearon para estimular a las células T CD8+ provenientes de los bazo para los ensayos de la proliferación celular. A) estimulación *in vitro* de las células T CD8+ de los ratones inmunizados con BPO-9 o NPO-9 que no portan tumores. 75 días después de la inmunización se extrajeron los esplenocitos (Inmunización). B) estimulación *in vitro* de las células T CD8+ de los ratones inmunizados con BPO-9 o NPO-9, 60 días después de la inmunización se realizó el implante tumoral y 15 días después del implante se extrajeron los esplenocitos (Profiláctico). C) Células T CD8+ de los ratones inmunizados con BPO-9 o NPO-9 portadores de tumor extraídos 15 días después del implante tumoral, los ratones se inmunizaron al día 5 postimplante (Terapéutico). D) Estimulación de las células T CD8+ de los ratones intactos o de ratones portadores de tumor no tratados extraídos 15 días después del implante tumoral (reconocimiento natural). En los paneles de la derecha, cada punto representa una variante del epítipo utilizada como Ag en los ensayos de la proliferación de las células T CD8+. Los datos de la proliferación de las células T CD8+ (%) se presentan como la media \pm SEM. Los datos se analizaron al utilizar la prueba t de dos colas de Mann-Whitney. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El punto naranja representa la proliferación inducida por el epítipo silvestre, NFO-9 y el punto verde representa un epítipo no relacionado, B22 (A – D). Los datos se obtuvieron después de restar los valores del control negativo, sin estimulación, para cada tratamiento experimental. La línea punteada indica el promedio de proliferación celular obtenido al estimular ambos grupos experimentales con B22. Los datos corresponden a un experimento. Los ratones intactos se definen como no inmunizados y no portadores de tumores.

8.4 Las BEV inducen una alta frecuencia de células T efectoras y una baja frecuencia de células inmunosupresoras

Nuestros hallazgos hasta ahora nos llevaron a considerar la presencia de células T infiltrantes de tumor en los ratones tratados con las BEV, ya que estos se asocian con mayores respuestas inmunes antitumorales. Por lo tanto, se obtuvieron secciones del tejido tumoral de los ratones tratados con las BEV para determinar físicamente la presencia de las células T en el microambiente del tumor. Los TIL se obtuvieron al día 30 después del implante tumoral y se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica. Interesantemente, los TIL CD8+ aumentaron 6,8 y 4,8 veces en los grupos de tratamiento con las BEV BPO-43 y BPO-9, respectivamente, en comparación con el grupo de control 4T1, mientras que los grupos tratados con las contrapartes WT, NPO-43 y NPO-9, tuvieron valores más bajos (Figura 18A). Esta observación fue comprobada por inmunohistofluorescencia en los tejidos tumorales, donde los ratones tratados con las BEV mostraron una mayor presencia de los TIL CD8+ (Figura suplementaria C). Los resultados para los TIL CD4+ fueron similares, es decir, se observó un aumento de 5,3 veces en los ratones inmunizados con BPO-43 y BPO-9, mientras que los grupos tratados con las contrapartes WT, tuvieron valores más bajos (Figura 18B). La presencia de TIL CD8+ y CD4+ fue mayor en los ratones tratados con las BEV en comparación con los grupos tratados con WT y Poly I:C.

Tumor

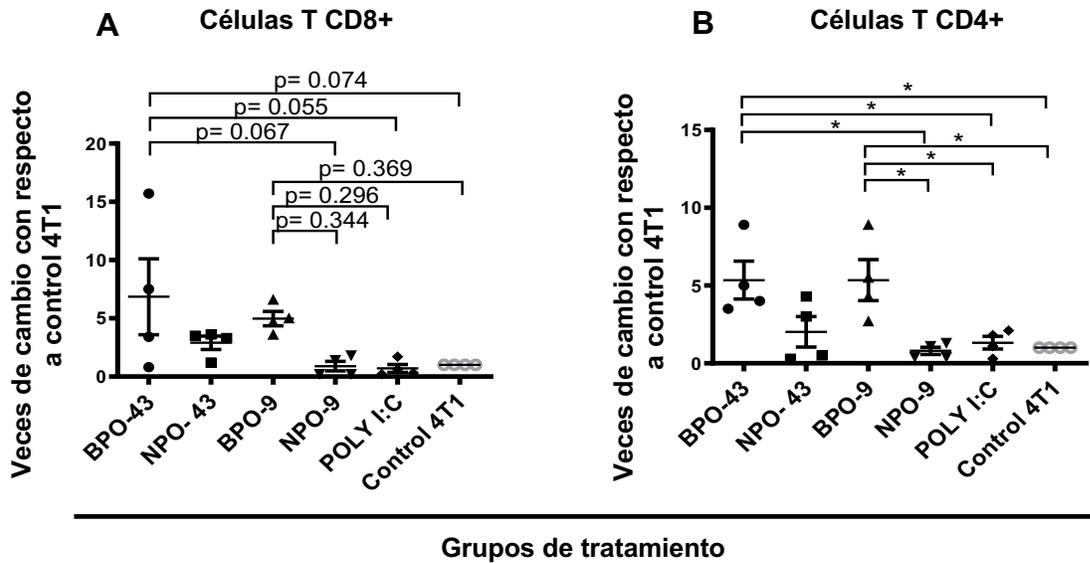


Figura 18. **Células infiltrantes del tumor CD8+ y CD4+ identificados en los ratones inmunizados con los inmunógenos BEV, WT, Poly I:C y ratones de control tumoral 4T1.** A) TIL totales CD8+ y B) CD4+ de los grupos experimentales. Los ratones se inmunizaron al día 5 después del implante tumoral y se sacrificaron al día 30 postimplante. Los resultados de la citometría de flujo muestran las veces de cambio en el número de las células T CD8+ y CD4+ dentro de los tumores en comparación con el control 4T1. Las veces de cambios se presentan como la media \pm SEM. Cada punto representa un grupo de tres tumores diferentes de cuatro experimentos independientes; n = 4; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Se realizó una ANOVA de una vía para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

Además, evaluamos la presencia de las células T efectoras CD8+Ly6C+ las cuales tienen propiedades antitumorales (Piranlioglu et al., 2019). Encontramos un aumento significativo en el número de las células T efectoras en los tumores de los ratones tratados con las BEV (Figura 19A), consistente con nuestras observaciones previas de las células T CD8+ (Figura 18A). Interesantemente, en las muestras de los pulmones de los ratones tratados con BPO-9 se observó un aumento estadísticamente significativo de las células T efectoras CD8+Ly6C+ cuando fue comparado con los grupos control 4T1, adyuvante Poly I:C y su contraparte WT, NFO-9. Además, cuando comparamos entre BFO-43 y BFO-9, observamos un aumento significativo de las células T efectoras CD8+Ly6C+ en los ratones tratados con BPO-9. Curiosamente, en las muestras de pulmón de los ratones tratados con NPO-43 se observó un aumento de las células T efectoras en comparación con su contraparte BEV, BPO-43 (Figura 19B); sin embargo, el número menor de células T efectoras no afectó la inhibición de la metástasis en los ratones tratados con BPO-43.

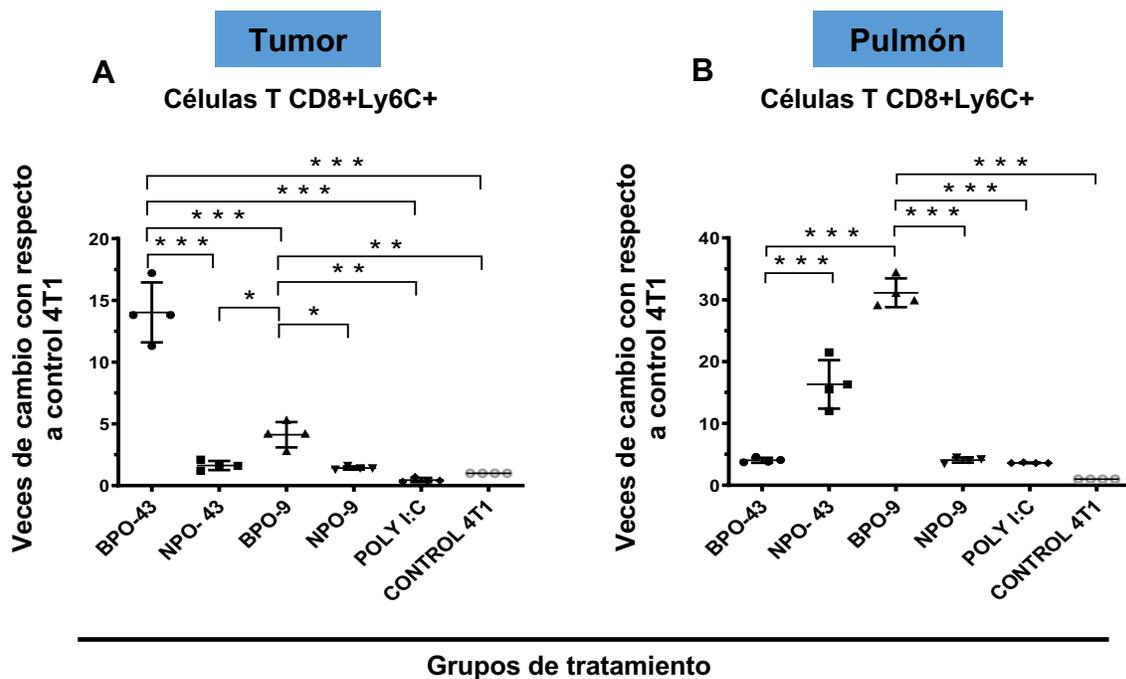


Figura 19. **Células T efectoras CD8+Ly6C+ inducidas por las BEV durante el tratamiento terapéutico.** Análisis *ex vivo* de la respuesta al tratamiento en (A) tumores y (B) pulmones. Los ratones se inmunizaron al día 5 después del implante tumoral y se sacrificaron al día 30 postimplante. Los resultados de la citometría de flujo muestran las veces de cambio del número de las células T efectoras dentro de los tumores y los pulmones, en comparación con los tejidos del grupo control 4T1. Las veces de cambios se presentan como la media \pm DE. Cada punto representa un conjunto de tres tumores y pulmones diferentes de cuatro experimentos independientes; $n = 4$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Se realizó una ANOVA de una vía para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

Además, analizamos la población de las células T efectoras CD8+ al medir la producción *ex vivo* del IFN- γ , la granzima B y la perforina en los tumores y los bazo de los ratones tratados (Figura 20). Observamos niveles significativamente altos de las células T CD8+IFN- γ + en los tumores de los ratones tratados con las BEV, BPO-43 y BPO-9. De manera similar, se observó un aumento de la población CD8+IFN- γ + en los bazo de los ratones tratados con BPO-9. También se observó una tendencia a un aumento de la población de las células T CD8+Perforina+ en los tumores de los ratones tratados con las BEV y en bazo un aumento significativo solo con ratones tratados con BPO-9. Asimismo, se observó un aumento significativo en el número de las células T CD8+granzima B+ en los tumores de los ratones inmunizados con BPO-43 (Figura 20A). En el caso de las células de bazo se observaron niveles significativamente altos de esta población de células T solo en las muestras de los ratones vacunados con BPO-9 (Figura 20B).

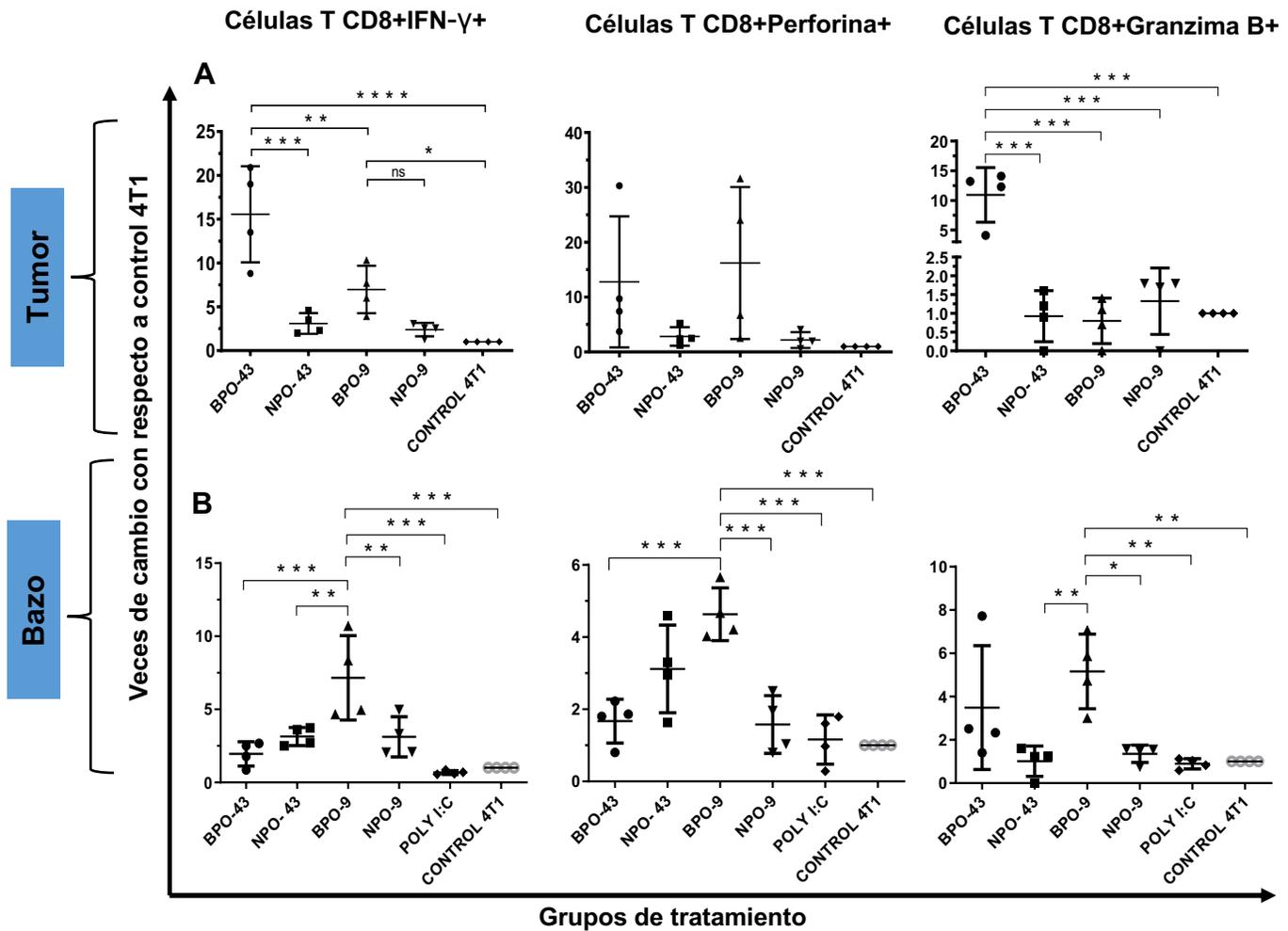


Figura 20. **Inmunofenotipos de las células T CD8+ derivadas de los ratones tratados con las BEV.** Análisis *ex vivo* de los linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ , granzima B y perforina que se encuentran en (A) los tumores y (B) los bazo. Los números de células T del grupo control 4T1 se consideraron de referencia y se calcularon las veces de cambios con respecto al control 4T1. Las veces de cambio se presentan como la media \pm DE, cada punto representa un conjunto de tres tumores y bazo diferentes de cuatro experimentos independientes; $n = 4$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Se realizó una ANOVA de una vía para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

Las G-MDSC y las Treg son potentes inhibidores de las respuestas inmunitarias antitumorales y promueven la progresión tumoral; por lo tanto, es importante determinar su presencia durante la terapia del cáncer. Analizamos muestras de los pulmones y los tumores, que son los sitios importantes para las respuestas inmunitarias activas dentro del modelo tumoral utilizado. El análisis de muestras reveló números bajos de las G-MDSC en los ratones tratados con las BEV (Figura 21A-B). Estos datos, junto con las observaciones de las células T efectoras en los tumores y los pulmones, pueden explicar la reducción significativa del número de las metástasis en los animales tratados con las BEV. El número de las células

Treg disminuyó en los tumores y los pulmones de los ratones tratados con las BEV (Figura 21A-B). Sin embargo, esta población de células aumentó en los pulmones de los ratones tratados con la BEV BPO-43 (Figura 21A-B).

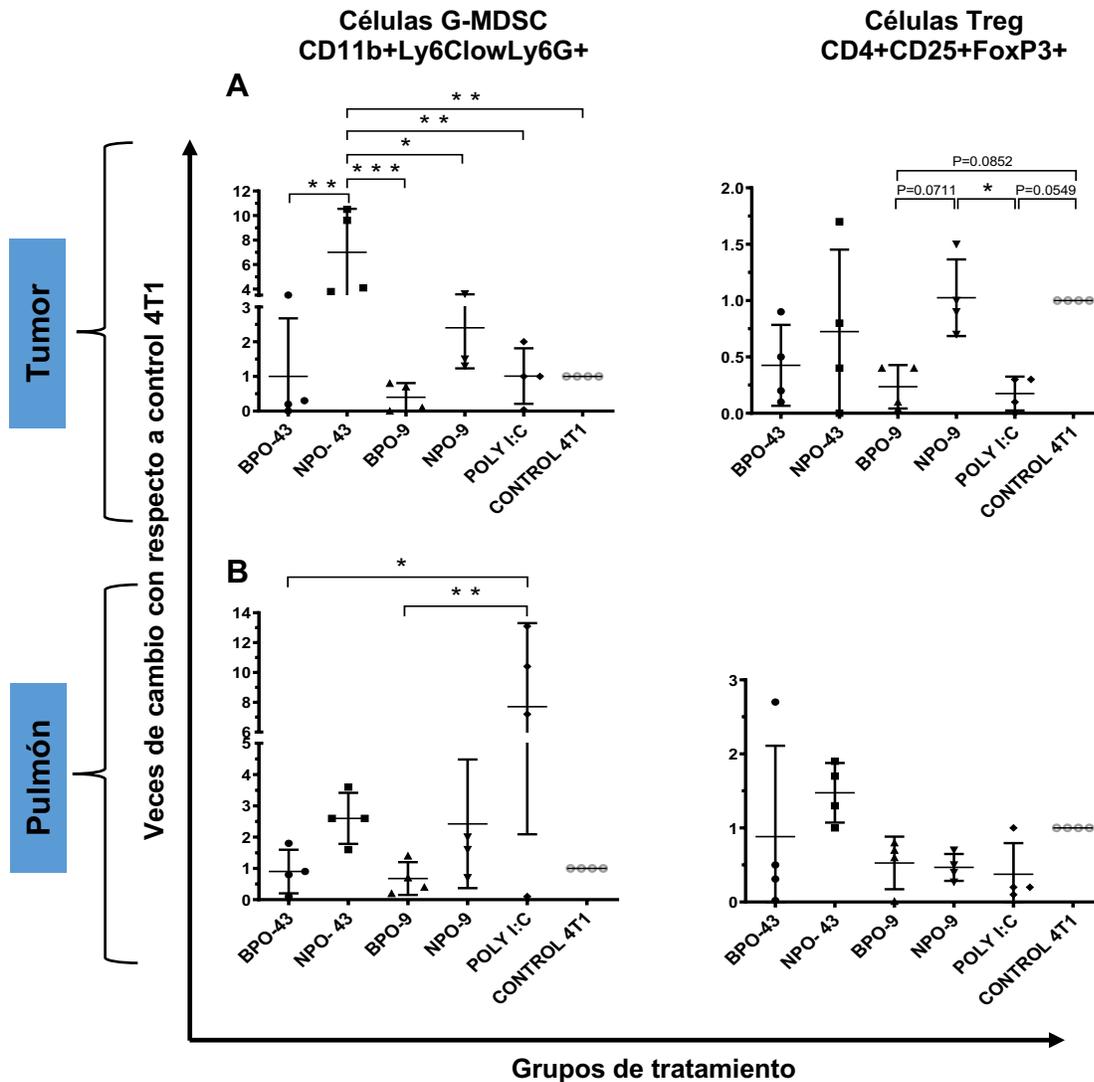


Figura 21. **Determinación de las células supresoras G-MDSC y T reguladoras inducidas por las BEV durante el tratamiento terapéutico.** Análisis *ex vivo* de la respuesta al tratamiento en (A) tumores y (B) pulmones. Los resultados de la citometría de flujo muestran las veces de cambio del número de las células T supresoras y reguladoras dentro de los tumores y los pulmones en comparación con los tejidos del grupo control 4T1. Las veces de cambios se presentan como la media \pm DE. Cada punto representa un conjunto de tres tumores y pulmones diferentes de cuatro experimentos independientes; $n = 4$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Se realizó una ANOVA de una vía para mediciones repetidas y la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

9. DISCUSIÓN

Actualmente, existe una tendencia hacia la inmunoterapia personalizada centrada en los neoantígenos como blancos terapéuticos. Incluso se ha sugerido aprovechar a las células T específicas de neoantígenos como una estrategia común en todas las posibles modalidades de inmunoterapia para lograr respuestas antitumorales (De Mattos-Arruda et al., 2020). Sin embargo, los resultados al momento indican que la inmunoterapia no siempre es exitosa y no aporta beneficios sobre la terapia convencional. Por ejemplo, con frecuencia se observa una menor eficacia de la inmunoterapia de ICI en los pacientes (Fares et al., 2019) con tumores que presentan una carga mutacional baja (Kim et al., 2019), como el TNBC en humanos y en el modelo murino de tumor análogo 4T1 (Schrörs et al., 2020). El resultado final de las interacciones de la respuesta inmunitaria contra el cáncer está influenciado por complejos mecanismos de evasión del tumor, que gobiernan la fuerza y el momento de las respuestas antitumorales (Schreiber et al., 2011; Chen y Mellman, 2017; Van den Eynden et al., 2019). En la actualidad, ninguna vacuna contra el cáncer propuesta ha tomado en consideración la evasión inmunitaria o la variabilidad antigénica. Por lo tanto, es de suma importancia reestructurar a los antígenos utilizados en las vacunas para generar respuestas inmunitarias similares a las que se producen naturalmente, pero en un marco de tiempo más eficiente: las respuestas inmunitarias deben adelantarse a la aparición de mutaciones que llevarían a la variabilidad antigénica. De esta manera, los inmunógenos BEV abordan directamente la variabilidad antigénica, además de ofrecer un enfoque alternativo y universal para generar vacunas contra los patógenos antigénicamente variables y el cáncer (Servín-Blanco et al., 2016). Preveamos que la presentación simultánea de un gran número de variantes de los epítomos con los inmunógenos de las BEV generará el repertorio más extenso de las células T efectoras. Esto nos permitirá apuntar directamente hacia la heterogeneidad intratumoral y abordar la variabilidad antigénica.

En este trabajo, se generaron las BEV basadas en el epítomo silvestre o WT de OFA/iLRP (NPO-9, KRTWEKLLL) y una región multiepitópica más grande (NPO-43, INLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFA) donde se encuentran varios epítomos reconocidos por las células T CD8+ que se identificaron previamente mediante el mapeo de epítomos (Rohrer et al., 2006). Curiosamente, estos epítomos se reportaron como péptidos con afinidad moderada a la molécula de clase I del MHC (H-2K) para el haplotipo d por puntaje de parker y tubingen (Rohrer et al., 2006). Los epítomos de NPO-43, KRTWEKLLL y RNTGQRAVL, lograron estimular a las células T para producir citocinas y generar citotoxicidad. Además, el epítomo RNTGQRAVL mostró una inhibición de las metástasis pulmonares en un modelo de fibrosarcoma (Rohrer et al., 2006). Asimismo, otros epítomos que comparten la secuencia central idéntica de KLLLAARAI logró estimular respuestas espontáneas de células T de los pacientes con neoplasias hematopoyéticas (Siegel et al., 2006). Esto indica que la capacidad de unión de los

epítomos a la molécula de clase I del MHC no interfiere necesariamente con las interacciones pMHC/TCR y en las funciones efectoras de las células T (Bentzen et al., 2018). Merece la pena mencionar que existen trabajos que describen la aplicación terapéutica de otro miembro de los antígenos oncofetales, OFA 5T4, que es una molécula de superficie compartida entre el trofoblasto humano y las células tumorales y que ha sido utilizado como superantígeno blanco a un tumor, un conjugado de un anticuerpo-fármaco dirigido contra OFA 5T4, candidato a una vacuna o se ha empleado como blanco para las células T quiméricas del receptor de Ag (Stern y Harrop, 2017). En el presente estudio, demostramos la efectividad de nuestra plataforma de vacunas basados en BEV y sus efectos antitumorales en un modelo murino de TNBC luego del tratamiento con ambas BEV. Aquí, demostramos que las BEV BPO-43 y BPO-9, contienen bibliotecas combinatorias de epítomos/péptidos mutantes de 43 y 9 aminoácidos, respectivamente que inhibieron significativamente el crecimiento tumoral y las metástasis pulmonares (Figura 14 y 15). Los efectos antitumorales inducidos por los tratamientos validan la estrategia de las BEV como un candidato para la inmunoterapia contra el cáncer. El modelo de tumor 4T1 es poco inmunogénico que se caracteriza por un crecimiento tumoral rápido y por la formación de metástasis espontánea. Estas características también se observan en los cánceres de mama humanos en estadio IV (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001; Wang et al., 2020). Se ha reportado que la inmunoterapia con ICI no pudo inhibir el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores 4T1 (Kim et al., 2014). En el mismo estudio, se demostró una inhibición fuerte pero temporal del crecimiento tumoral y una reducción de la metástasis en los ratones supervivientes; sin embargo, solo después de cuatro dosis de una mezcla de 4 componentes (Kim et al., 2014). De acuerdo con esto, demostramos efectos antitumorales inducidos por las BEV después de una sola dosis, en contraste con los protocolos de tratamiento estándar, que utilizan varias intervenciones para controlar la progresión de la enfermedad. El uso de una dosis en el tratamiento es un indicativo de mayor eficacia además de proporcionar un mayor acceso del tratamiento para los pacientes con cáncer (costo/beneficio).

Previamente hemos informado el uso de diferentes epítomos de CTL provenientes de varios TAA que se generaron como inmunógenos BEV y se administraron como una monoterapia de dosis única en el modelo de tumor 4T1 donde obtuvimos resultados similares. Esto demuestra la relevancia del concepto BEV y su adaptabilidad (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Servín-Blanco et al., 2018; Domínguez-Romero et al., 2020). Interesantemente, observamos una reducción significativa de las lesiones metastásicas cuando se utilizan los inmunógenos BEV en formato de péptido sintético o bacteriófago recombinante (Figura 14C y 15C), lo que resulta en un aumento en la amplitud de los repertorios de las células T CD8+ y CD4+, que en última instancia fomentan las respuestas antitumorales deseables (Figura 18, 19 y 20). El tratamiento con la BEV BFO-43 en formato de bacteriófago recombinante fue menos eficiente en el control de los tumores en comparación con su contraparte en el formato de péptido sintético

posiblemente debido a que el repertorio de la BEV en el bacteriófago fue menor (BFO-43 55 500 vs BPO-43 64 × 10⁶ variantes). Interesantemente, el tratamiento con BFO-9 funcionó mejor que BFO-43 y debido a que BFO-9 es una biblioteca de menor complejidad (BFO-43 55 500 vs BFO-9 8 505 variantes) no se puede asegurar que el tamaño del repertorio de las BEV sea el único factor por considerar para justificar sus efectos antitumorales. Probablemente, estos resultados reflejan que el epítipo de 9 aminoácidos del cual se partió para la construcción de BPO-9 es inmunodominante dentro de la secuencia de 43. Además, el formato de bacteriófago filamentosos son inmunógenos complejos con una amplia diversidad de epítopos derivados de las proteínas virales y con una posibilidad de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el bacteriófago que constituye un riesgo en el fracaso del tratamiento (Łusiak-Szelachowska et al., 2014). Esto pudiera justificar la tendencia que observamos que el formato de péptidos sintéticos tuvo un mayor efecto antitumoral cuando se comparó con el formato de bacteriófago filamentosos. Además, el uso del adyuvante poly (I:C) en el formato de péptido sintético también podría justificar la eficacia terapéutica. Se ha informado que el Poly (I:C) induce la estimulación de la inmunidad innata además de la secreción de citocinas proinflamatorias y ha mostrado efecto antitumoral en combinación con terapias de CAR-T y en vacunas de neoepítopos que se encuentran en fase clínica (Di et al., 2019; Niemi et al., 2022).

Cualquier vacuna terapéutica contra el cáncer debería inducir respuestas de CTL contra los tumores; por lo tanto, la producción del IFN- γ por las células T es fundamental para activar la inmunidad contra el cáncer. En nuestro esfuerzo por dilucidar el problema, demostramos que la producción de IFN- γ por las células T CD4⁺ y CD8⁺, obtenidas de los ratones tratados con BPO-43, fue mayor en respuesta a las variantes de BFO-9 que al inmunógeno BFO-43 utilizado inicialmente. Como esperábamos, las células T CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺ obtenidas de los bazo de los ratones tratados con BPO-9 mostraron un reconocimiento más fuerte hacia sus propios Ags individuales, en comparación con la secuencia más grande de BPO-43, aunque el epítipo WT de 9 aminoácidos se encuentra dentro del epítipo WT de 43. Esta es una indicación clara de mayor inmunogenicidad de la BEV BPO-9 sobre la BEV BPO-43 (Figura 16A-B). Decidimos probar el inmunógeno BEV de 43 aminoácidos para favorecer las respuestas de las células T CD4⁺, crucial para las respuestas eficientes de los CTL. De acuerdo con lo anterior, un estudio informado por Kreiter y colaboradores (Kreiter et al., 2015) demostraron que la vacunación con neoepítopos de 27 aminoácidos en formato de ARN aumentó las respuestas de las células T CD4⁺ en 3 modelos de tumor diferentes, además modificó el microambiente del tumor e indujo respuestas de CTL. Vale la pena mencionar que la vacunación con la BEV BPO-9 de 9 aminoácidos indujo altos niveles de células T CD4⁺ intratumoral y CD4⁺IFN- γ ⁺ en los bazo de los ratones portadores de tumor (Figura 16B y 18B), probablemente, debido a la propia naturaleza de BPO-9 que porta la mezcla de miles de variantes de epítopos de 9 aminoácidos. Interesantemente, Gross y colaboradores

demonstraron la capacidad de péptidos cortos (9 o 10 aminoácidos) para activar a las células T CD4+ en un ensayo de vacunación en los pacientes con cáncer (Gross et al., 2016). A pesar de la ausencia de los epítomos reconocidos por las células T CD4+, hemos demostrado previamente que las BEV de 9 aminoácidos pueden inducir respuestas de células T CD8+, CD4+ y células T moderadamente autorreactivas que se superponen con respuestas inmunitarias específicas con propiedades antitumorales (NoeDominguez-Romero et al., 2014).

En consecuencia, se demostró que el reconocimiento de 24 variantes del epítomo derivadas del repertorio de BPO-9, por las células T CD8+ obtenidas de los ratones inmunizados con la BPO-9 fue mayor en comparación con los ratones inmunizados con NPO-9, lo que refleja la inmunogenicidad superior de la BEV sobre el WT (Figura 17A; 19 vs 5 variantes). Estos datos coinciden con nuestros previos reportes que utilizan inmunógenos de BEV basados en los epítomos, reconocidos por los CTL, de 9 aminoácidos derivados del VIH-1 y del TAA survivina que reflejan una característica general intrínseca de los inmunógenos basados en la estrategia de las BEV (Pedroza-Roldan et al., 2009; NoeDominguez-Romero et al., 2014). La amplia cobertura de posibles blancos de Ag por los repertorios de TCR inducidos por las BEV puede tener una importancia crítica para la eficacia de la vacuna, ya que el panorama antigénico de los tumores es muy complejo y en gran medida impredecible. Se ha informado que los neoepítomos tumorales no mutados, que provienen de las secuencias líderes procesados por las peptidasas son independiente del procesamiento proteasómico y del transportador asociado con el procesamiento de antígenos y pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario (Leclerc et al., 2019). Por lo tanto, incluso los Ag WT relacionados con el cáncer podrían ser el objetivo o blanco de la vacunación (Sahin et al., 2020).

Nuestros datos de estudios de inmunización profiláctico como terapéutico indican que, en el estado de la enfermedad, el reconocimiento del epítomo está alterado, lo que conduce a la inhibición de la proliferación de las células T para una fracción de las variantes del epítomo de BPO-9 (Figura 17). Este fenómeno puede deberse a las respuestas de los CTL protectores inducidas por la inmunización con la BPO-9, lo que podría ser perjudicial para el tumor. Sin embargo, la inmunosupresión tumoral no interfirió con la eficacia de las vacunas BEV (Figura 21A-B.). La supresión de las respuestas de las células T inducida por el tumor durante la terapia también podría atribuirse a cambios dinámicos dentro del inmunopeptidoma del tumor y a la presión selectiva por las respuestas de los CTL específicos por los antígenos tumorales, lo que da como resultado la ganancia, pérdida o regulación a la baja de los Ags blanco (Matsushita et al., 2012; Dharmaraj et al., 2019). Es importante destacar que existe evidencia en los cánceres humanos de que el reconocimiento de los neoantígenos por las células T o TIL se puede perder o ganar debido a la presión selectiva durante el tratamiento con las inmunoterapias ACT o ICI (Verdegaal et al., 2016; Anagnostou et al., 2017; Riaz et al., 2017). Además, los cambios dinámicos y la pérdida selectiva de los clones de neoantígeno de alta calidad en la progresión metastásica, sugiere la inmunoección

del neoantígeno (Balachandran et al., 2017). Los análisis multidimensionales recientes de las muestras de carcinoma de una cohorte de 100 pacientes mostraron múltiples mecanismos de evasión inmunitaria dentro de los tumores individuales, lo que resalta en una fuerte presión del sistema inmunitario dirigido hacia los neoantígenos durante la evolución del cáncer (Rosenthal et al., 2019). La compleja imagen de las interacciones tumor y respuesta inmunitaria puede ser complementada con estudios que muestran que los epítomos mutados, que se unen con una menor predicción de unión a las moléculas de clase I y de clase II del MHC, se seleccionan positivamente durante la tumorigénesis; esto indica que la inmunoección restringida por la MHC da forma al panorama mutacional del cáncer (Marty et al., 2017, 2018). A pesar de la variabilidad en el panorama de reconocimiento de epítomos, nuestros estudios de células T indican que los inmunógenos BEV derivados de OFA/iLRP pueden inducir un repertorio diverso de células T específicas de antígeno de tumor.

Interesantemente, la vacunación con BPO-43 y BPO-9 indujo la reducción de las células G-MDSC en los tumores en comparación con las muestras del grupo NPO-43, donde se observó un incremento de estas células. De manera similar, encontramos una disminución de las células G-MDSC en los pulmones de los ratones vacunados con las BEV en comparación con los ratones tratados con el adyuvante (Figura 21A-B), lo que sugiere una eliminación de las células 4T1, debido a que las células 4T1 liberan quimioatrayentes que incrementan el número de células G-MDSC en pulmón y bazo (Bosiljic et al., 2019); por lo tanto, una modulación a la baja de la inmunosupresión de las células G-MDSC es consecuencia de la activación de las células T y eliminación de las células 4T1 (Figura 18, 19 y 20). Normalmente en el modelo de tumor 4T1 se caracteriza por un incremento de las poblaciones de MDSC. De manera interesante, se ha demostrado que la inhibición de las células MDSC mejora el resultado de la enfermedad en los modelos de tumores murinos (Markowitz et al., 2013). Asimismo, se ha informado que la eliminación de las células G-MDSC en el modelo tumoral 4T1 reduce la carga metastásica (Ouzounova et al., 2017). Además, Piranlioglu y colaboradores demostraron que la transferencia adoptiva de las células G-MDSC aisladas de los ratones portadores de tumores 4T1 inducen metástasis al suprimir a las células T CD8+ en los ratones sensibilizados con los tumores EMT6 (Piranlioglu et al., 2019). Debido a la repercusión de las Treg en el éxito de las inmunoterapias se decidió evaluar la presencia de esta población. No obstante, no observamos una disminución significativa, pero sí una tendencia a la baja de las células Treg en los tumores y pulmones de los ratones vacunados con las BEV (Figura 21A-B). Sin embargo, esta población aumentó en los pulmones de los ratones tratados con la BEV BPO-43, lo que puede contribuir a la inmunomodulación de la respuesta de las células T efectoras (Figura 21A-B). En general, estos hallazgos sugieren que la disminución de la infiltración de las células G-MDSC en los tumores y los pulmones puede explicar la reducción en el crecimiento tumoral y la metástasis, respectivamente luego del tratamiento con las BEV de OFA/iLRP. Lo que respalda

la activación de las células T y la modulación de una respuesta inmunitaria positiva con una inmunosupresión menor. Además, la presencia de CTL con fenotipos variables puede estar relacionada con la reducción general de las G-MDSC y las Treg, lo que permite respuestas celulares duraderas mediante inmunización con las BEV (Figura 19, 20 y 21).

Interesantemente, la incorporación de epítomos/péptidos derivados de OFA/iLRP en nanoclusters de péptidos (PNC) para mejorar la inmunogenicidad, resultó en una presentación significativa de péptidos por las DC, una mayor retención en el sitio de inyección intradérmica y difusión pasiva a los ganglios linfáticos (Tsoras y Champion, 2018). En general, nuestros hallazgos proporcionan evidencia adicional de que los inmunógenos basados en BEV merecen estudios en profundidad para mejorar los efectos antitumorales mediante el uso de BEV basados en TAA o neoantígenos además de diferentes sistemas de entrega o adyuvantes de vacunas (Lynn et al., 2020; Shemesh et al., 2020).

10. CONCLUSIONES

- Los inmunógenos BEV de 9 y 43 aminoácidos mostraron tener efecto reduciendo el crecimiento tumoral y el número de las macrometástasis pulmonares al ser utilizadas como vacunas terapéuticas mediante una sola aplicación tanto en el formato de péptido sintético como presentados en bacteriófago filamentoso.
- La BEV diseñada a partir de una región multiepitópica de 43 aminoácidos con epítomos inmunodominantes de 9 aminoácidos induce respuesta de células T CD8+ y CD4+, que es fundamental para el desarrollo de vacunas basadas en respuestas citotóxicas.
- Las BEV tienen la capacidad de inducir una amplia gama de respuestas de células T variante específicas en comparación con el epítomo silvestre, lo que muestra una inmunogenicidad superior debido al reconocimiento de las variantes de los epítomos después de la inmunización.

11. PERSPECTIVAS

Resultaría interesante evaluar el efecto antitumoral por medio del análisis de citocinas con ensayos de ELISpot o por análisis multiplex, para observaciones más amplias de los perfiles de respuestas en el sistema inmune.

Sería oportuno seguir con la evaluación del efecto de las BEV en formato de péptido sintético para así eliminar el efecto del bacteriófago que sirve como acarreador. Además, seguir con la prueba de otras estrategias de adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria.

También sería interesante generar inmunógenos en formato de células dendríticas activadas con los péptidos provenientes de las BEV o de las variantes inmunogénicas seleccionadas para ser más eficiente la activación de las células T CD8+ y CD4+ contra los tumores.

12. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, A., Uddin, S., Steinhoff, M. (2020). CAR-T Cell Therapies: An Overview of Clinical Studies Supporting Their Approved Use against Acute Lymphoblastic Leukemia and Large B-Cell Lymphomas. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3906. <https://doi.org/10.3390/ijms21113906>.

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., et al. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.

Anagnostou, V., Smith, K. N., Forde, P. M., et al. (2017). Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*, 7(3), 264-276. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0828>.

Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., et al. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>.

Balachandran, V.P., Łuksza, M., Zhao, J.N., et al. (2017). Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature*, 551(7681), 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature24462>.

Barsoum, A. L., Liu, B., Rohrer, J. W., et al. (2009). Production, safety and antitumor efficacy of recombinant Oncofetal Antigen/immature laminin receptor protein. *Biomaterials*, 30(17), 3091–3099. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.022>.

Barsoum, A. L., Schwarzenberger, P. O. (2014). Oncofetal antigen/immature laminin receptor protein in pregnancy and cancer. *Cellular & molecular biology letters*, 19(3), 393-406. <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0203-7>.

Beck, J. D., Reidenbach, D., Salomon, N., et al. (2021). mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Molecular cancer*, 20(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01348-0>.

Bentzen, A. K., Such, L., Jensen, K. K., et al. (2018). T cell receptor fingerprinting enables in-depth characterization of the interactions governing recognition of peptide-MHC complexes. *Nat. Biotechnol.* 36, 1191-1196. <https://doi.org/10.1038/nbt.4303>.

Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., et al. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British journal of cancer*, 120(1), 6–15. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0328-y>.

Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S. A., et al. (1990). Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7762–7766. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7762>.

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, 373(17), 1627–1639. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>.

Bosiljic, M., Cederberg, R. A., Hamilton, M. J., et al. (2019). Targeting myeloid-derived suppressor cells in combination with primary mammary tumor resection reduces metastatic growth in the lungs. *Breast cancer research : BCR*, 21(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1189-x>.

Butò, S., Tagliabue, E., Ardini, E., et al. (1998). Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *Journal of cellular biochemistry*, 69(3), 244–251. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19980601\)69:3<244::aid-jcb2>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19980601)69:3<244::aid-jcb2>3.0.co;2-r).

Castronovo, V., Taraboletti, G., Sobel, M. E. (1991). Functional domains of the 67-kDa laminin receptor precursor. *The Journal of biological chemistry*, 266(30), 20440–20446.

Castronovo V. (1993). Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion & metastasis*, 13(1), 1–30. PMID: 8407208.

Cavallaro, U., Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(2), 118–132. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>.

Charles-Niño, C., Pedroza-Roldan, C., Viveros, M., et al. (2011). Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody response. *Vaccine*, 29(32), 5313–5321. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.007>.

Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., et al. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5323–5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>.

Cheever, M. A., Higano, C. S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(11), 3520–3526. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3126>.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., et al. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular cancer research: MCR*, 6(10), 1521–1533. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>.

Chen, D.S., Mellman, I., (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>.

Coggin, J.H., Jr, Anderson, N.G. (1974). Cancer differentiation and embryonic antigens: some central problems. *Adv. Cancer Res.* 19, 105–165.

Coggin, J. H., Jr, Adkinson, L., Anderson, N. G. (1980). Fetal antigens shared as transplantation rejection antigens on chemically induced mouse and hamster sarcomas. *Cancer research*, 40(5), 1568–1573.

Coggin, J. H., Jr, Rohrer, J. W., Barsoum, A. L. (2004). True immunogenicity of oncofetal antigen/immature laminin receptor protein. *Cancer research*, 64(13), 4685. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2940>.

Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., Waldmann, T. A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 39(1), 6–21. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>.

Crown, J., O'Leary, M. (2000). The taxanes: an update. *Lancet (London, England)*, 355(9210), 1176–1178. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02074-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02074-2).

Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., et al. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & molecular medicine*, 50(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>.

De Mattos-Arruda, L., Vazquez, M., Finotello, F., et al. (2020). Neoantigen prediction and computational perspectives towards clinical benefit: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann. Oncol.* 31, 978–990. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.05.008>.

Dharmaraj, N., Piotrowski, S.L., Huang, C., et al. (2019). Anti-tumor immunity induced by ectopic expression of viral antigens is transient and limited by immune escape. *Oncoimmunology* 8(4), e1568809. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1568809>.

Di, S., Zhou, M., Pan, Z., Sun, R., Chen, M., Jiang, H., Shi, B., Luo, H., & Li, Z. (2019). Combined Adjuvant of Poly I:C Improves Antitumor Effects of CAR-T Cells. *Frontiers in oncology*, 9, 241. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00241>.

Domínguez-Romero, A. N., Martínez-Cortés, F., Munguía, M. E., et al. (2020). Generation of multiepitope cancer vaccines based on large combinatorial libraries of survivin-derived mutant epitopes. *Immunology*, 161(2), 123–138.

<https://doi.org/10.1111/imm.13233>.

Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., et al. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(32), 5233–5239.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.5449>.

Dunn, G. P., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), 836–848.

<https://doi.org/10.1038/nri1961>.

Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., Mami-Chouaib, F. (2018). Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 9, 14.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00014>.

Ekeruche-Makinde, J., Clement, M., Cole, D. K., et al. (2012). T-cell receptor-optimized peptide skewing of the T-cell repertoire can enhance antigen targeting. *The Journal of biological chemistry*, 287(44), 37269–37281.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386409>.

Fares, C.M., Van Allen, E.M., Drake, C.G., et al. (2019). Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients?. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 39, 147–164.

https://doi.org/10.1200/EDBK_240837.

Fennemann, F. L., de Vries, I., Figdor, C. G., et al. (2019). Attacking Tumors From All Sides: Personalized Multiplex Vaccines to Tackle Intratumor Heterogeneity. *Frontiers in immunology*, 10, 824.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00824>.

Friedrichs, B., Siegel, S., Kloess, M., et al. (2008). Humoral immune responses against the immature laminin receptor protein show prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 180(9), 6374–6384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6374>.

Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J. M., et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24), 12472–12508.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2998>.

Gao, Y., Shang, Q., Li, W., et al. (2020). Antibiotics fir cancer treatment: A double-edged sword. *Journal of Cancer*, 11(17), 5135-5149.

<https://doi.org/10.7150/jca.47470>.

Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., et al. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 372(21), 2018–2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>.

Gee, M. H., Han, A., Lofgren, S. M., et al. (2018). Antigen Identification for Orphan T Cell Receptors Expressed on Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cell*, 172(3), 549–563.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.043>.

Goldstein, D., Laszlo, J. (1988). The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA: a cancer journal for clinicians*, 38(5), 258–277. <https://doi.org/10.3322/canjclin.38.5.258>.

Gross, S., Lennerz, V., Gallerani, E., et al. (2016). Short peptide vaccine induces CD4+ T helper cells in patients with different solid cancers. *Cancer Immunol. Res.* 4(1), 18–25. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0105>.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., et al. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.

Hevener, K., Verstak, T. A., Lutat, K. E., et al. (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 8(6), 844–861. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.07.008>.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.

Holtan, S. G., Creedon, D. J., Haluska, P., et al. (2009). Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clinic proceedings*, 84(11), 985–1000. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)60669-1](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)60669-1).

Hicklin, D. J., Wang, Z., Arienti, F., et al. (1998). beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *The Journal of clinical investigation*, 101(12), 2720–2729. <https://doi.org/10.1172/JCI498>.

Hu, Z., Ott, P. A., Wu, C. J. (2018). Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nature reviews. Immunology*, 18(3), 168–182. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.131>.

Hu, Z., Leet, D. E., Allesøe, R. L., et al. (2021). Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01206-4>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2020). Comunicación Social. Estadísticas a Propósito del Día Mundial de la Lucha contra el Cáncer de mama (19 de Octubre). México, D.F. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUCHACANCER2021.pdf.

Igney, F. H., Krammer, P. H. (2005). Tumor counterattack: fact or fiction?. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 54(11), 1127–1136. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0680-7>.

Janerich D. T. (2001). The fetal antigen hypothesis: cancers and beyond. *Medical hypotheses*, 56(1), 101–103. <https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1119>.

Jiang, T., Zhou, C., Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 5(6), e1163462. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>.

Jovanovic, K., Chetty, C. J., Khumalo, T., et al. (2015). Novel patented therapeutic approaches targeting the 37/67 kDa laminin receptor for treatment of cancer and Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic patents*, 25(5), 567–582. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1014802>.

Kader, T., Hill, P., Zethoven, M., et al. (2019). Atypical ductal hyperplasia is a multipotent precursor of breast carcinoma. *The Journal of pathology*, 248(3), 326–338. <https://doi.org/10.1002/path.5262>.

Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine*, 363(5), 411–422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>.

Khan, M., Maker, A. V., Jain, S. (2021). The Evolution of Cancer Immunotherapy. *Vaccines*, 9(6), 614. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060614>.

Khong, H. T., Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology*, 3(11), 999–1005. <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>.

Kim, J. Y., Kronbichler, A., Eisenhut, M., et al. (2019). Tumor Mutational Burden and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*, 11(11), 1798. <https://doi.org/10.3390/cancers11111798>.

Kim, K., Skora, A. D., Li, Z., et al. (2014). Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived

cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(32), 11774–11779.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1410626111>.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>.

Kindt, J. T., Goldsby A. R., Osborne. A. B. (2007). Complejo mayor de histocompatibilidad y presentación de antígeno. Ed Mc Graw Hill. 6ª edición. Inmunología de Kuby. México. Pp.189-222.

Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., et al. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *British journal of cancer*, 73(2), 148–153. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.28>.

Kreiter, S., Vormehr, M., Van de Roemer, N., et al. (2015). Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, 520(7549), 692–696. <https://doi.org/10.1038/nature14426>.

Kute, T., Stehle, J. R., Jr, Ornelles, D., et al. (2012). Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology*, 1(6), 810–821.
<https://doi.org/10.4161/onci.20447>.

Lam, H., McNeil, L. K., Starobinets, H., et al. (2021). An Empirical Antigen Selection Method Identifies Neoantigens That Either Elicit Broad Antitumor T-cell Responses or Drive Tumor Growth. *Cancer discovery*, 11(3), 696–713.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0377>.

Landowski, T. H., Dratz, E. A., Starkey, J. R. (1995). Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry*, 34(35), 11276–11287. <https://doi.org/10.1021/bi00035a037>.

Lansiaux A. (2011). Les antimétabolites (Antimetabolites). *Bulletin du cancer*, 98(11), 1263–1274. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1476>.

Lazarus, H. M., Ragsdale, C. E., Gale, R. P., et al. (2021). Sargramostim (rhu GM-CSF) as Cancer Therapy (Systematic Review) and An Immunomodulator. A Drug Before Its Time?. *Frontiers in immunology*, 12, 706186.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706186>.

Lazoura, E., Lodding, J., Farrugia, W., et al. (2009). Non-canonical anchor motif peptides bound to MHC class I induce cellular responses. *Molecular immunology*, 46(6), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.11.007>.

Leclerc, M., Mezquita, L., Guillebot De Nerville, G., et al. (2019). Recent advances in lung cancer immunotherapy: input of T-cell epitopes associated with impaired peptide processing. *Front. Immunol.* 10, 1505.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01505>.

Lee, C. H., Yelensky, R., Jooss, K., et al. (2018). Update on Tumor Neoantigens and Their Utility: Why It Is Good to Be Different. *Trends in immunology*, 39(7), 536–548. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.005>.

Li, C., Jiang, P., Wei, S., et al. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular cancer*, 19(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01234-1>.

Li, L., Petrovsky, N. (2016). Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert review of vaccines*, 15(3), 313–329.

<https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>.

Litterman, A. J., Dudek, A. Z., Largaespada, D. A. (2013). Alkylating chemotherapy may exert a uniquely deleterious effect upon neo-antigen-targeting anticancer vaccination. *Oncoimmunology*, 2(10), e26294. <https://doi.org/10.4161/onci.26294>.

Llopiz, D., Ruiz, M., Infante, S., et al. (2017). IL-10 expression defines an immunosuppressive dendritic cell population induced by antitumor therapeutic vaccination. *Oncotarget*, 8(2), 2659–2671.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13736>.

Lopes, A., Bastiancich, C., Bausart, M., et al. (2021). New generation of DNA-based immunotherapy induces a potent immune response and increases the survival in different tumor models. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(4), e001243. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001243>.

Lopes, A., Vandermeulen, G., Pr at, V. (2019). Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 146. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1154-7>.

Łusiak-Szelachowska, M., Zaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., et al. (2014). Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral immunology*, 27(6), 295–304. <https://doi.org/10.1089/vim.2013.0128>.

Lynn, G. M., Sedlik, C., Baharom, F., et al. (2020). Peptide-TLR-7/8a conjugate vaccines chemically programmed for nanoparticle self-assembly enhance CD8 T-cell immunity to tumor antigens. *Nat. Biotechnol.* 38(3), 320–332.

<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0390-x>.

Mahmoud, F., Shields, B., Makhoul, I., et al. (2017). Immune surveillance in melanoma: From immune attack to melanoma escape and even

counterattack. *Cancer biology & therapy*, 18(7), 451–469.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1323596>.

Makowski L. (1994). Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr Opin Struct Biol*, 4(2), 225–30.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90312-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90312-3).

Manoutcharian K. (2005). Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert review of vaccines*, 4(1), 5–7.
<https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.5>.

Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T. R., Carson, W. E., 3rd (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 140(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7>.

Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., et al. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 14(Suppl 2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.

Marty, R., Thompson, W.K., Salem, R.M., et al. (2018). Evolutionary pressure against MHC class II binding cancer mutations. *Cell* 175(2), 416–428.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.048>.

Marty, R., Kaabinejadian, S., Rossell, D., et al. (2017). MHC-I genotype restricts the oncogenic mutational landscape. *Cell* 171(6), 1272–1283.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.050>.

Marvel, D., Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of clinical investigation*, 125(9), 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>.

Marvin D. A. (1998). Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology*, 8(2), 150–158. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80032-8](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80032-8).

Massagué J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.

Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482(7385), 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature10755>.

McClintock, S. D., Warner, R. L., Ali, S., et al. (2015). Monoclonal antibodies specific for oncofetal antigen--immature laminin receptor protein: Effects on tumor

growth and spread in two murine models. *Cancer biology & therapy*, 16(5), 724–732. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1026484>.

Mehta, S. R., Suhag, V., Semwal, M., et al. (2010). Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Medical journal, Armed Forces India*, 66(2), 158–162. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(10\)80132-7](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(10)80132-7).

Ménard, S., Tagliabue, E., Colnaghi, M. I. (1998). The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast cancer research and treatment*, 52(1-3), 137–145. <https://doi.org/10.1023/a:1006171403765>.

Montaño Estrada, L. F., Rendón Huerta, E. P. (2016). *Citocinas*. Mendoza, C (Ed.), *INMUNOLOGÍA molecular, celular y traslacional* (pp. 258-297). Wolters Kluwer.

Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., et al. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of global oncology*, 3(6), 740–748. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>.

Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R., et al. (2018). Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *European Journal of Cancer*, 93(0), 10–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.002>.

Mullen, L. M., Nair, S. P., Ward, J. M., et al. (2006). Phage display in the study of infectious diseases. *Trends in microbiology*, 14(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.01.006>.

Niemi, J. V. L., Sokolov, A. V., & Schiöth, H. B. (2022). Neoantigen Vaccines; Clinical Trials, Classes, Indications, Adjuvants and Combinatorial Treatments. *Cancers*, 14(20), 5163. <https://doi.org/10.3390/cancers14205163>.

NoeDominguez-Romero, A., Zamora-Alvarado, R., Servín-Blanco, R., et al. (2014). Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 3201–3213. <https://doi.org/10.4161/hv.29679>.

Novellino, L., Castelli, C., Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 54(3), 187–207. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0560-6>.

Nurgali, K., Jagoe, R. T., Abalo, R. (2018). Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 245. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>.

Orrantia-Borunda, E. (2022). Subtypes of Breast Cancer. En H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer* (pp. 31-42). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer>.

Ott, P. A., Hu, Z., Keskin, D. B., et al. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*, 547(7662), 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature22991>.

Ouzounova, M., Lee, E., Piranlioglu, R., et al. (2017). Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nature communications*, 8, 14979. <https://doi.org/10.1038/ncomms14979>.

Overdijk, M. B., Verploegen, S., Bögels, M., et al. (2015). Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *mAbs*, 7(2), 311–321. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1007813>.

Pavlick, A., Blazquez, A. B., Meseck, M., et al. (2020). Combined Vaccination with NY-ESO-1 Protein, Poly-ICLC, and Montanide Improves Humoral and Cellular Immune Responses in Patients with High-Risk Melanoma. *Cancer immunology research*, 8(1), 70–80. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0545>.

Pedroza-Roldan, C., Charles-Niño, C., Saavedra, R., et al. (2009). Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Molecular immunology*, 47(2-3), 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.024>.

Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., et al. (2015). Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides medical journal*, 6(1), e0004. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10179>.

Perou C. M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist*, 15 Suppl 5, 39–48. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-S5-39>.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

Peters G. J. (2014). Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 33(4-6), 358-374. <https://doi.org/10.1080/15257770.2014.894197>.

Piranlioglu, R., Lee, E., Ouzounova, M., et al. (2019). Primary tumor-induced immunity eradicates disseminated tumor cells in syngeneic mouse model. *Nature communications*, 10(1), 1430. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09015-1>.

Poggi, A., Zocchi, M. R. (2006). Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Archivum*

immunologiae et therapiae experimentalis, 54(5), 323–333.
<https://doi.org/10.1007/s00005-006-0038-7>.

Pon, J. R., Marra, M. A. (2015). Driver and passenger mutations in cancer. *Annual review of pathology*, 10, 25–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312>.

Prang, N., Preithner, S., Brischwein, K., et al. (2005). Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *British journal of cancer*, 92(2), 342–349.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602310>.

Pulaski, B. A., Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*, Chapter 20.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.

Qi, H., Lu, H., Qiu, H. J., et al. (2012). Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*, 417(3), 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>.

Ramos-Casals, M., Brahmer, J.R., Callahan, M.K., et al. (2020). Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Dis. Primers* 6, 1–21.
<https://doi.org/10.1038/s41572-020-0160-6>.

Redman, B. G., Chang, A. E., Whitfield, J., et al. (2008). Phase Ib trial assessing autologous, tumor-pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 31(6), 591–598. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31817fd90b>.

Riaz, N., Havel, J. J., Makarov, V., et al. (2017). Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell*, 171(4), 934–949.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.028>.

Ribas, A., Hamid, O., Daud, A., et al. (2016). Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*, 315(15), 1600–1609. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4059>.

Rodi, D., Mandava, S., Makowski, L. (2005). Filamentous Bacteriophage Structure and Biology. En: Sachdev S (ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*. NW. USA, CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 1 - 62.

Rohrer, W. J., Barsoum, L. A., Coggin, H. J. Jr. (2006). Identification of Oncofetal Antigen/Immature Laminin Receptor Protein Epitopes That Activate BALB/c Mouse OFA/iLRP-specific Effector and Regulatory T cell clones, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(5), 2844–2856.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2844>.

Rohrer, J. W., Barsoum, L. A., Dyess, D. L., et al. (1999). Human breast carcinoma patients develop clonable oncofetal antigen-specific effector and regulatory T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), 6880–6892. PMID: 10352310.

Rosenthal, R., Cadieux, E.L., Salgado, R., et al. (2019). Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature*, 567(7749), 479–485. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1032-7>.

Sahin, U., Derhovanessian, E., Miller, M., et al. (2017). Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, 547(7662), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature23003>.

Sahin, U., Oehm, P., Derhovanessian, E., et al. (2020). An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*, 585(7823), 107–112. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2537-9>.

Schreiber, R. D., Old, L. J., Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.

Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., et al. (2020). Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front. Oncol.* 10, 1195. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>.

Secondini, C., Coquoz, O., Spagnuolo, L., et al. (2017). Arginase inhibition suppresses lung metastasis in the 4T1 breast cancer model independently of the immunomodulatory and anti-metastatic effects of VEGFR-2 blockade. *Oncoimmunology*, 6(6), e1316437. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1316437>.

Secretaría de Salud (2015). Información Estadística. Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. México, D.F.: gob.mx. Recuperado el 26 de enero de 2022 de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.

Secretaría de Salud (2016). Información Estadísticas Cáncer de Mama. Programa de Acción. México, D.F.: gob.mx. Recuperado el 26 de enero de 2022 de <https://www.gob.mx/salud/cnegsr/acciones-y-programas/informacion-estadistica-cancer-de-mama>.

Servín-Blanco, R., Zamora-Alvarado, R., Gevorkian, G., et al. (2016). Antigenic variability: Obstacles on the road to vaccines against traditionally difficult targets. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(10), 2640–2648. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1191718>.

- Servín-Blanco, R., Chávaro-Ortiz, R. M., Zamora-Alvarado, R., et al. (2018). Generation of cancer vaccine immunogens derived from major histocompatibility complex (MHC) class I molecules using variable epitope libraries. *Immunology letters*, 204, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.008>.
- Sharma, A., Boise, L. H., Shanmugam, M. (2019). Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. *Cancers*, 11(8), 1144. <https://doi.org/10.3390/cancers11081144>.
- Shay, J. W., Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>.
- Shemesh, C.S., Hsu, J.C., Hosseini, I., et al. (2020). Personalized cancer vaccines: clinical landscape, challenges, and opportunities. *Mol. Ther.* 29, 555–570. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.038>.
- Sidhu S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular engineering*, 18(2), 57–63. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(01\)00087-9](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(01)00087-9).
- Siegel, S., Wagner, A., Kabelitz, D., et al. (2003). Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood*, 102(13), 4416–4423. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0198>.
- Siegel, S., Wagner, A., Friedrichs, B., et al. (2006). Identification of HLA-A*0201-presented T cell epitopes derived from the oncofetal antigen-immature laminin receptor protein in patients with hematological malignancies. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(11), 6935–6944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6935>.
- Sioud M. (2019). Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Molecular biotechnology*, 61(4), 286–303. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00156-8>.
- Smith, N. C., Rise, M. L., Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in immunology*, 10, 2292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>.
- Song, W., Kong, H. L., Carpenter, H., et al. (1997). Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *The Journal of experimental medicine*, 186(8), 1247–1256. <https://doi.org/10.1084/jem.186.8.1247>.
- Stern, P.L., Harrop, R. (2017). 5T4 oncofetal antigen: an attractive target for immune intervention in cancer. *Cancer Immunol, Immunother.* 66(4), 415–426. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1917-3>.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Sun, Z. H., Chen, C., Kuang, X. W., et al. (2021). Breast surgery for young women with early-stage breast cancer: Mastectomy or breast-conserving therapy?. *Medicine*, 100(18), e25880. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025880>.

Susan G. Komen for the Cure®. Molecular Subtypes of Breast Cancer. Recuperado el 15 de agosto de 2020 de <https://www.komen.org/breast-cancer/diagnosis/molecular-subtypes/>.

Syed Khaja, A. S., Toor, S. M., El Salhat, H., et al. (2017). Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget*, 8(20), 33159–33171. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16565>.

Tang, C. K., Pietersz, G. A. (2009). Intracellular detection and immune signaling pathways of DNA vaccines. *Expert review of vaccines*, 8(9), 1161–1170. <https://doi.org/10.1586/erv.09.79>.

Tohme, S., Simmons, R. L., Tsung, A. (2017). Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer research*, 77(7), 1548–1552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536>.

Tsoras, A. N., Champion, J. A. (2018). Cross-linked peptide nanoclusters for delivery of oncofetal antigen as a cancer vaccine. *Bioconjug. Chem.* 29(3), 776–785. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00079>.

Vacchelli, E., Martins, I., Eggermont, A., et al. (2012). Trial watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology*, 1(9), 1557–1576. <https://doi.org/10.4161/onci.22428>.

Van den Eynden, J., Jiménez-Sánchez, A., Miller, M.L., et al. (2019). Lack of detectable neoantigen depletion signals in the untreated cancer genome. *Nat. Genet.* 51, 1741–1748. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0532-6>.

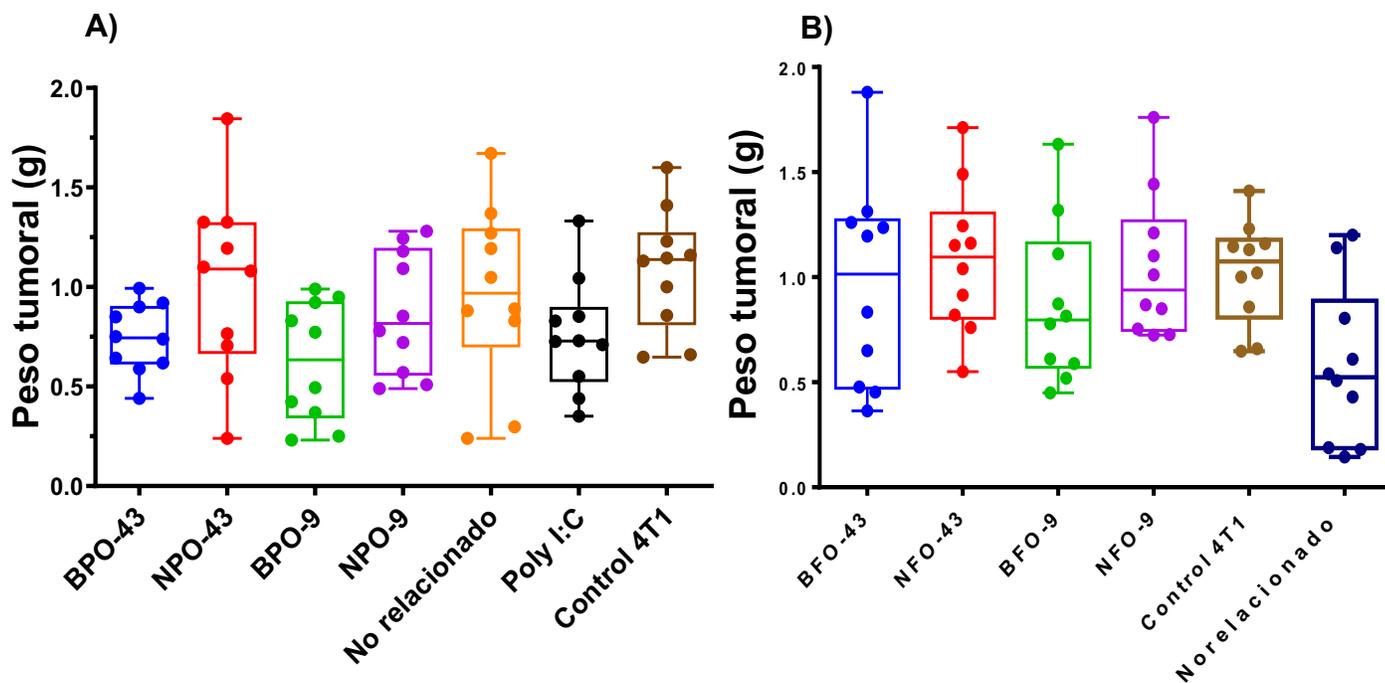
Vania, L., Morris, G., Otgaar, T. C., Bignoux, M. J., et al. (2019). Patented therapeutic approaches targeting LRP/LR for cancer treatment. *Expert opinion on therapeutic patents*, 29(12), 987–1009. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1693543>.

Vargo-Gogola, T., Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews. Cancer*, 7(9), 659–672. <https://doi.org/10.1038/nrc2193>.

- Verdegaal, E. M., de Miranda, N. F., Visser, M., et al. (2016). Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*, 536(7614), 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature18945>.
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., et al. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in cancer biology*, 35 Suppl, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>.
- Wang, H., Najibi, A.J., Sobral, M.C., et al. (2020). Biomaterial-based scaffold for in situ chemo-immunotherapy to treat poorly immunogenic tumors. *Nat. Commun.* 11(1), 5696. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19540-z>.
- Wang, S. E., Narasanna, A., Perez-Torres, M., et al. (2006). HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell*, 10(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.023>.
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., et al. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 20(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>.
- Wilgenhof, S., Van Nuffel, A. M., Corthals, J., et al. (2011). Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 34(5), 448–456. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31821dcb31>.
- Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., van den Berg, H. A., et al. (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *The Journal of biological chemistry*, 287(2), 1168–1177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289488>.
- Zhang, C., Duan, E., Cao, Y., et al. (2000). Effect of 32/67 kDa laminin-binding protein antibody on mouse embryo implantation. *Journal of reproduction and fertility*, 119(1), 137–142. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1190137>.
- Zilfou, J. T., Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>.
- Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), 701–702. <https://doi.org/10.1038/248701a0>.
- Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunology today*, 18(1), 14–17. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(97\)80008-4](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)80008-4).

13. SUPLEMENTOS

Figura suplementaria A. Pesos tumorales de ratones obtenidos al día 30 postimplante.



Pesos tumorales de ratones individuales de tratamiento terapéutico. A) Ratones hembra BALB/c se implantaron células 4T1 al día 5 postimplante y se trataron con 180 μ g de péptidos sintéticos más una cantidad igual del adyuvante Poly I:C se administraron como una sola dosis por vía s.c. B) Ratones hembra BALB/c se implantaron células 4T1 al día 5 postimplante y se trataron con bacteriófagos recombinantes se administraron como una única dosis por vía i.v. (1×10^{12} bacteriófagos).

Figura suplementaria B. Imágenes representativas de pulmones de ratones con lesiones metastásicas en tratamientos terapéutico al día 30 postimplante.

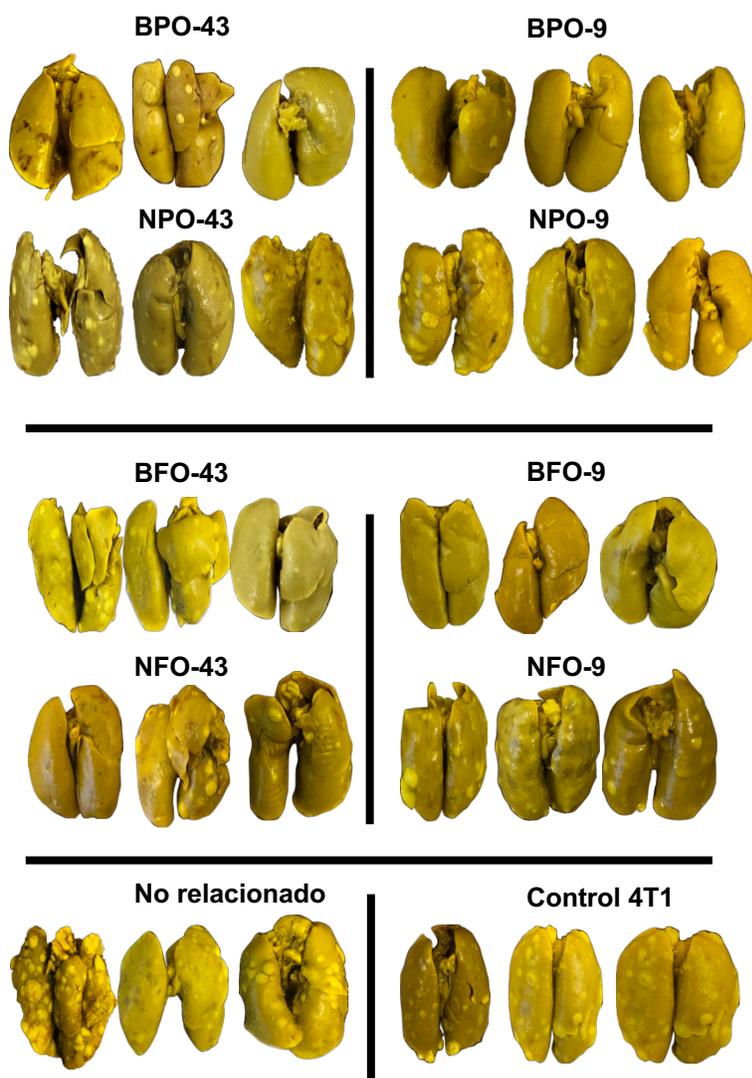
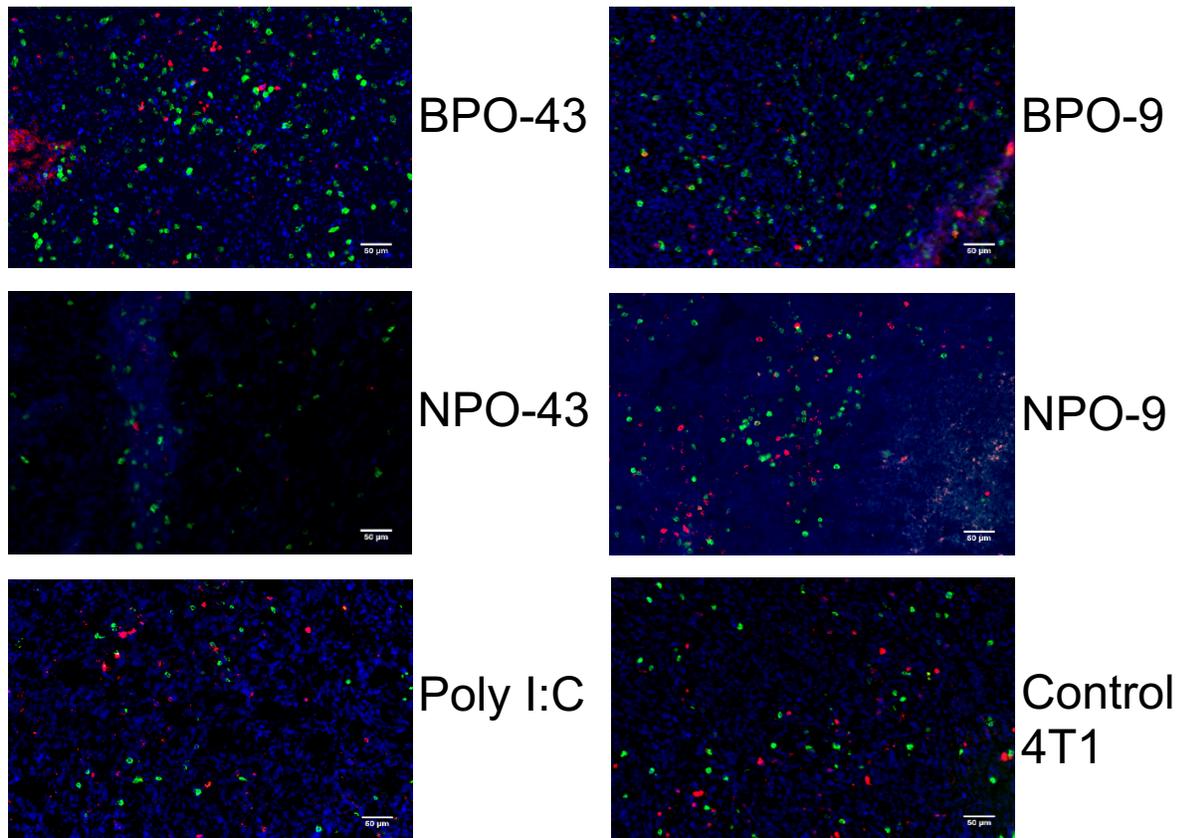


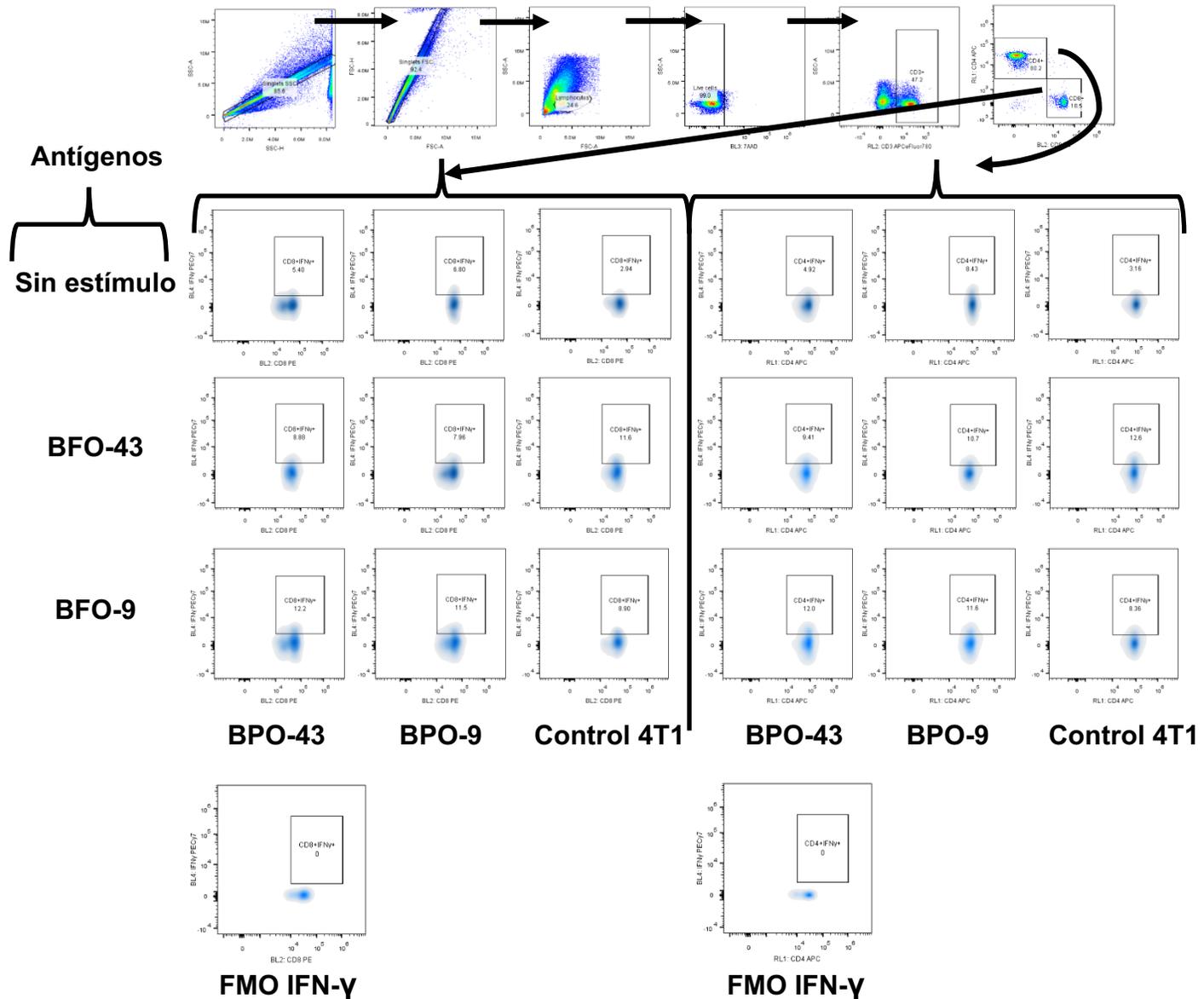
Imagen representativa de las lesiones metastásicas de los grupos de ratones inmunizados con las BEV y sus contrapartes WT en tratamiento terapéutico. Los números de las lesiones metastásicas se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$. $n = 10$. Las imágenes de los pulmones con las lesiones metastásicas se obtuvieron al día 30 postimplante. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados comparables.

Figura suplementaria C. Imágenes de Inmunohistofluorescencia de células T CD8+ y CD4+ de tumores de ratones en tratamiento terapéutico.



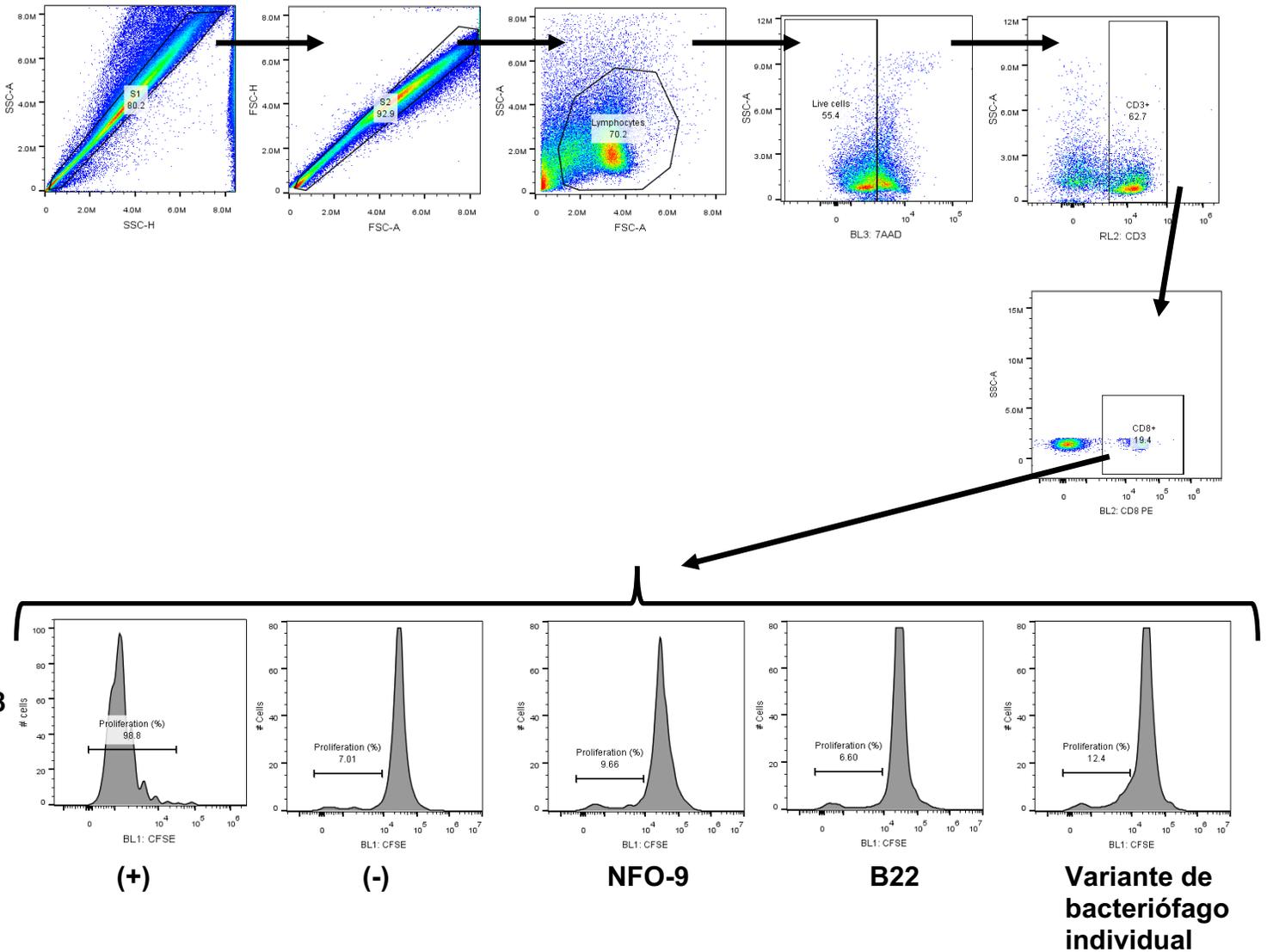
Imágenes de inmunohistofluorescencia representativas de células T CD8+ (Verde) y CD4+ (Rojo) de tumores de tratamientos terapéuticos. Los tumores se obtuvieron al día 30 postimplante. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. (Barra de escala: 50 µm). Datos obtenidos de al menos 3 experimentos independientes.

Figura suplementaria D. Análisis representativa de la estrategia de análisis para la identificación de células T C8+ y CD4+ productoras de IFN- γ .



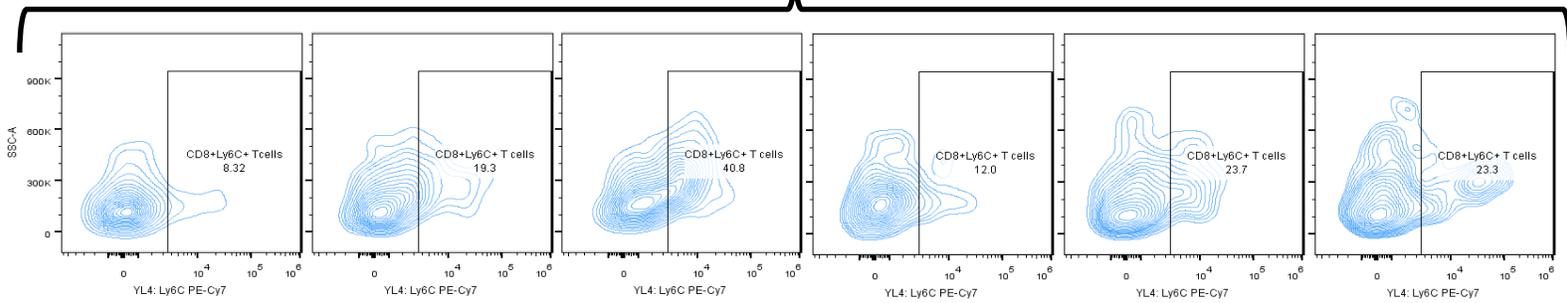
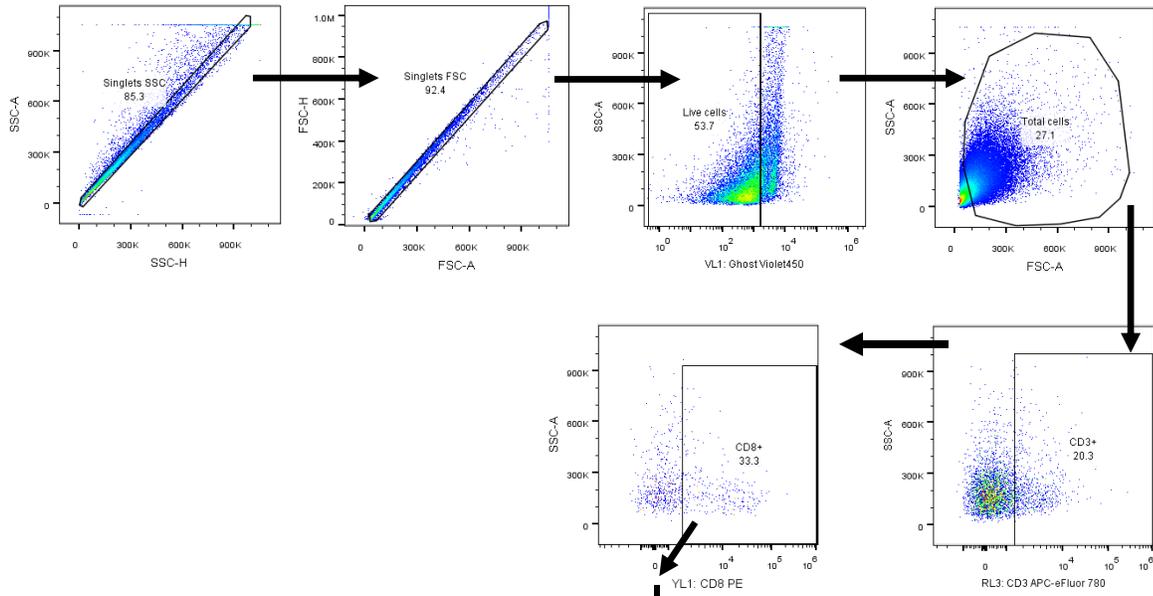
La estrategia de selección para la identificación de células T C8+ y CD4+ productoras de IFN- γ implicó la exclusión de dobletes y tripletes con los singletes, después se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) para seleccionar la población de células T, seguida de la exclusión de las células muertas con 7AAD. Posteriormente, se realizó un gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD3 para seleccionar la población de células CD3+, luego este fue dividido dentro de un gráfico de puntos para CD4 APC vs CD8 PE para seleccionar las poblaciones de células CD8+ y CD4+. Posteriormente, gráficos de densidad fueron generados para medir CD8+IFN- γ + y CD4+IFN- γ +. Se muestran gráficos de densidad representativo de los tratamientos con BPO-43, BPO-9 y control 4T1 y estimulados con BFO-43 y BFO-9 Ag. Control de fluorescencia menos uno (FMO) control FMO IFN- γ .

Figura suplementaria E. Análisis representativa de la estrategia de análisis para la proliferación de células T CD8+ derivadas de bazo y teñidas con CFSE.



La estrategia de selección para las células CD8+ en proliferación implicó la exclusión de dobletes y tripletes con los singletes, después se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) para seleccionar la población de células T totales, seguida de la exclusión de las células muertas con 7AAD. Posteriormente, se realizó un gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD3-A para seleccionar la población de células CD3+, luego este fue dividido dentro de un gráfico de puntos para granularidad (SSC-A) vs CD8 PE para seleccionar la población de células CD8+. Posteriormente, se generaron histogramas para medir los porcentajes de proliferación de células CD8+. Se muestran histogramas representativos: proliferación de CD8+ para una variante individual, secuencia de tipo silvestre, inmunógeno no relacionado (B22) y controles positivo y negativo.

Figura suplementaria F. Estrategia representativa para la identificación de células T efectoras CD8+Ly6C+ derivadas de pulmón obtenidas de ratones en tratamiento terapéutico.



BPO-43

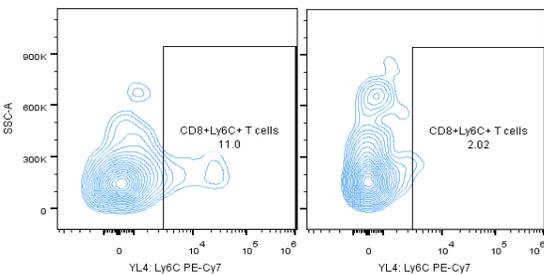
NPO-43

BPO-9

NPO-9

Poly I:C

Control 4T1

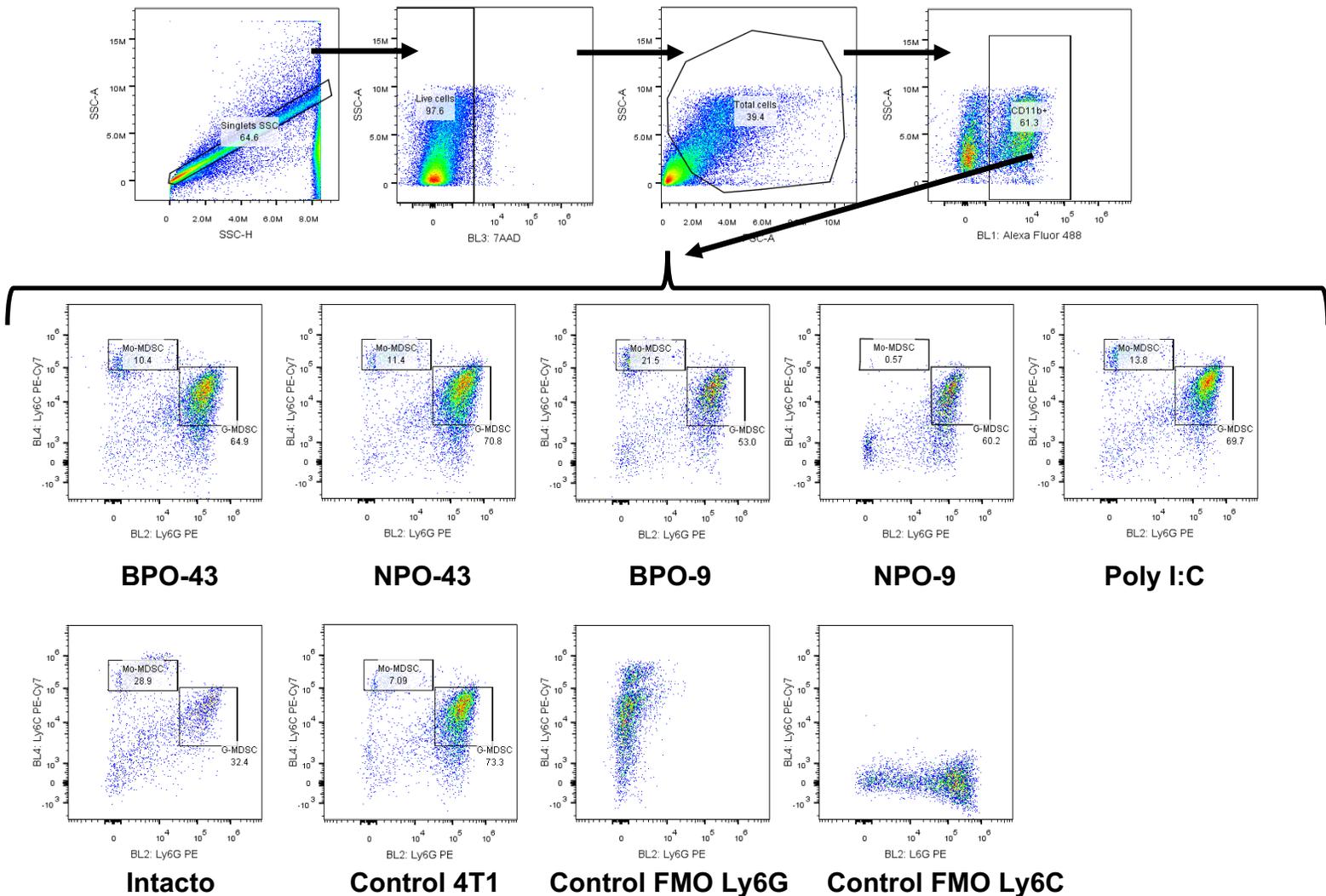


Intacto

Control FMO Ly6C

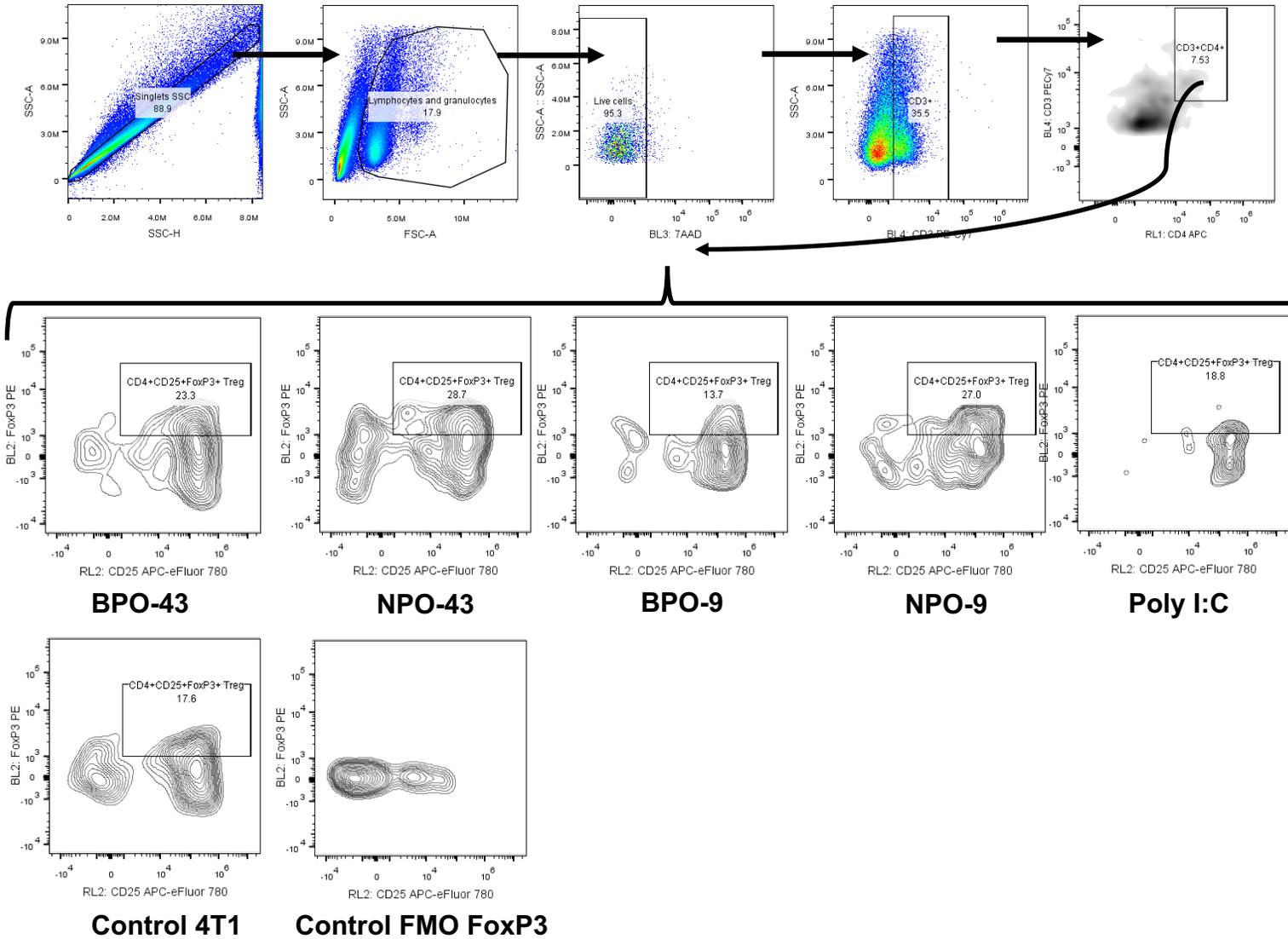
La estrategia de selección para la identificación de células T CD8+Ly6C+ implicó la exclusión de dobletes y tripletes con los singlets, seguida de la exclusión de las células muertas con 7AAD, después se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) para seleccionar la población de células totales. Posteriormente, se realizó un gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD3-A para seleccionar la población de células CD3+, luego se realizó otro gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD8-A para seleccionar la población de células CD8+. Finalmente, se realizó un gráfico de contorno para granularidad (SSC-A) vs Ly6C-A para medir la población de células T efectoras CD8+Ly6C+. Se muestran gráficos de contorno representativos para los tratamientos: BPO-43, NPO-43, BPO-9, NPO-9, Poly I:C, control 4T1 y ratón intacto. Control de fluorescencia menos uno (FMO) control FMO

Figura suplementaria G. Estrategia representativa del análisis para la identificación de células G-MDSC CD11b+Ly6CLowLy6G+ derivadas de pulmón obtenidas de ratones en tratamiento terapéutico.



La estrategia de selección para la identificación de células G-MDSC CD11b+Ly6CLowLy6G+ implicó la exclusión de dobletes y tripletes con un singlete, seguida de la exclusión de las células muertas con 7AAD, después se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) para seleccionar la población de células totales. Posteriormente, se realizó un gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD11b-A para seleccionar la población de células CD11b+, Finalmente, se realizó un gráfico de puntos para Ly6C-A vs Ly6G-A para medir las poblaciones de células G-MDSC CD11b+Ly6CLowLy6G+ y Mo-MDSC CD11b+Ly6CHighLy6G+. Se muestran gráficos de puntos representativos para los tratamientos BPO-43, NPO-43, BPO-9, NPO-9, Poly I:C, control 4T1 y ratón intacto. Control de fluorescencia menos uno (FMO) control FMO Ly6G y control FMO Ly6C.

Figura suplementaria H. Estrategia representativa del análisis para la identificación de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+ derivadas de tumor obtenidas de ratones en tratamiento terapéutico.



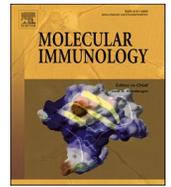
La estrategia de selección para la identificación de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+ implicó la exclusión de dobletes y tripletes con un singlete, después se realizó un gráfico de puntos de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) para seleccionar la población de células T totales, seguida de la exclusión de las células muertas con 7AAD. Posteriormente, se realizó un gráfico de puntos de granularidad (SSC-A) vs CD3-A para seleccionar la población de células CD3+, seguido de un gráfico de densidad para CD3-A vs CD4-A para seleccionar la población de células CD3+CD4+. Finalmente, se realizó un gráfico de contorno para FoxP3-A vs CD25-A para medir la población de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+. Se muestran gráficos de contorno representativos para los tratamientos BPO-43, NPO-43, BPO-9, NPO-9, Poly I:C y control 4T1. Control de fluorescencia menos uno (FMO) control FMO FoxP3.



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Generation of cancer vaccine immunogens derived from Oncofetal antigen (OFA/iLRP) using variable epitope libraries tested in an aggressive breast cancer model

Fernando Martínez-Cortés, Rodolfo Servín-Blanco, Allan Noé Domínguez-Romero, María Elena Munguía, Jesus Guzman Valle, Josué Odales, Goar Gevorkian, Karen Manoutcharian*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70228, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Antigenic variability
Cancer vaccine
4T1 tumor
Recombinant M13 phage
Combinatorial peptide library
Variable epitope library

ABSTRACT

After decades of cancer vaccine efforts, there is an imperious necessity for novel ideas that can lead to better tumor control in patients. We have proposed the use of a novel Variable Epitope Library (VEL) strategy, which incorporates an unprecedented number of mutated epitopes to target antigenic epitopes and break tolerance against tumor-associated antigens. Here, we used an oncofetal antigen/immature laminin receptor protein-derived sequence to generate 9-mer and 43-mer VEL immunogens. 4T1 tumor-bearing mice developed epitope-specific CD8⁺IFN- γ ⁺ and CD4⁺IFN- γ ⁺ T cell responses after treatment. Tumor and lung analysis demonstrated that VELs could increase the number of tumor-infiltrating lymphocytes with diverse effector functions while reducing the number of immunosuppressive myeloid-derived suppressor and regulatory T cells. Most importantly, VEL immunogens inhibited tumor growth and metastasis after a single dose. The results presented here are consistent with our previous studies and provide evidence for VEL immunogens' feasibility as promising cancer immunotherapy.

1. Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most heterogeneous and aggressive breast cancer subtype, characterized by a high recurrence rate and mortality. Few treatment options exist for TNBC due to the lack of identified therapeutic targets. This has led to the development of important immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors (ICI), primarily α -CTLA4 and α -PD-L1/PD-1 monoclonal antibodies, and cancer vaccines (Durgeau et al., 2018). Thus far, ICI combination therapy has been effective in several high mutational burden cancers, where they have induced tumor regression; however, only a subset of patients exhibits responsiveness (Durgeau et al., 2018; Fennemann et al., 2019). ICI may also lead to immune-related adverse events, which are usually not severe, but in rare cases, may lead to mortality (Ramos-Casals et al., 2020). Currently, many cancer vaccine formulations exist; similarly, the

list of delivery systems, vaccination schedules, and adjuvants being tested is extensive (Shemesh et al., 2021). Despite these advances, no medical agency has yet approved a vaccine for TNBC, partially due to their limited efficacy in controlling disease progression. Traditionally, cancer vaccines have been based on tumor-associated antigens (TAAs): non-mutated self-molecules which can be broadly subdivided into overexpressed, differentiation and cancer germline antigens (Ags). In most cases, TAA-based vaccines resulted in weaker antigen-specific immune responses due to central and peripheral tolerance mechanisms (Fennemann et al., 2019; Valilou and Rezaei, 2019).

At present, neo-antigens (Neo-Ags) are at the forefront of personalized cancer vaccines (Schumacher et al., 2019; Shemesh et al., 2021). Neo-Ags develop through nonsynonymous somatic mutations and are exclusively expressed by tumor cells. Proponents of Neo-Ag vaccines suggest that these characteristics confer increased immunogenicity, as

Abbreviations: VEL, variable epitope library; TNBC, triple-negative breast cancer; TAAs, tumor-associated antigens; Ag, antigen; ICS, intracellular staining; ICI, immune checkpoint inhibitors; DRiPs, defective ribosomal products; ACT, adoptive T cell therapy; ITH, intratumoral heterogeneity; CTL, cytotoxic T lymphocyte; OFA/iLRP, oncofetal Ag/immature laminin receptor; G-MDSC, granulocytic myeloid-derived suppressor cells; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte.

* Corresponding author.

E-mail address: karman@unam.mx (K. Manoutcharian).

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.08.013>

Received 23 March 2021; Received in revised form 13 August 2021; Accepted 20 August 2021

0161-5890/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Neo-Ags are not subject to immune tolerance; furthermore, Neo-Ags present a lower risk for developing autoimmunity during therapy (Fennemann et al., 2019; Valilou and Rezaei, 2019). However, it should be noted that genetic instability in cancer, which can lead to diverse molecular events (frameshift mutations, alternative splicing, gene fusion, generation of neoepitopes from defective ribosomal products (DRIPs), etc.), generates an overwhelming pool of Neo-Ags, of which the primary structures are mostly unpredictable (Yang et al., 2019; Pandey et al., 2020). Despite the frequently mentioned success of specific Phase I clinical trials utilizing Neo-Ag-based vaccines (Ott et al., 2017; Sahin et al., 2017), in many cases, such as glioblastoma (Hilf et al., 2019; Keskin et al., 2019) or other solid tumors (Cafri et al., 2020; Ott et al., 2020), low immunogenicity, particularly the inability to induce robust CD8+ T cell responses, has been reported. It is worth mentioning that during the only Phase 3 clinical trial, using Neo-Ag-based vaccines in glioblastoma patients, no increase in patient survival was reported (Weller et al., 2017). These trials have demonstrated the feasibility, safety, and immunogenicity of Neo-Ag-based vaccines; however, evidence of their clinical relevance is still lacking.

One concerning issue which directly limits Neo-Ag-based immunotherapy is the dynamic Neo-Ag landscape (gain/loss of Ag expression), evidenced under ICI treatment or adoptive T cell therapy (ACT) in melanoma patients (Anagnostou et al., 2017; Riaz et al., 2017). In fact, the gain/loss of Ags represents a significant and unappreciated obstacle in the development of cancer vaccines: strong selective pressure by the immune system makes cancer a moving target. Dynamic changes during tumor evolution increase antigenic variability and intratumoral heterogeneity (ITH) (Schreiber et al., 2011; Servín-Blanco et al., 2016; Fennemann et al., 2019), which correlate with a weaker immune response, decreased immune cell infiltration, and worse survival in breast cancer patients (McDonald et al., 2019). Also, escape from immune surveillance by immune tolerance and immunosuppression are further obstacles that need to be considered during vaccine design (Schreiber et al., 2011; Servín-Blanco et al., 2016; Dersh et al., 2021). The cancer immunoediting theory states that continuous tumor-immune interaction leads to the development of cancer cell variants that can escape from immune attack and to an immunosuppressive microenvironment, characterized by Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs) (Syed Khaja et al., 2017; Nagarajan and McArdle, 2018).

In recent publications, we have showcased our VEL vaccine platform, based on massively mutated epitopes to target antigenically variable pathogens and cancer. VEL immunogens are combinatorial libraries bearing heavily mutated immunodominant cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope variants: 30–50 % of the residues are randomly replaced by any of the 20 natural amino acids. Previously, we demonstrated that VEL-induced T cells could recognize more than 50 % of the heavily mutated variants from an HIV-1 CTL epitope; moreover, sera from VEL-immunized mice were capable of neutralizing 5/10 primary viral isolates from a Tier 2 reference panel (Charles-Niño et al., 2011). In a later study, we generated a VEL immunogen derived from MHC class I molecules that inhibited lung metastasis in a mouse model of breast cancer (Servín-Blanco et al., 2018). Furthermore, we reported that a survivin-derived VEL immunogen inhibits tumor growth in prophylactic and therapeutic settings (NoeDominguez-Romero et al., 2014). Most recently, survivin-derived VELs were further developed and were able to induce broad cellular immune responses, increase tumor infiltration by T cells, decrease immunosuppression and inhibit lung metastasis (Domínguez-Romero et al., 2020).

In the present study, we have chosen the oncofetal Ag/immature laminin receptor (OFA/iLRP), which is highly conserved and expressed in many cancer types: breast, head and neck, ovarian, brain, prostate, and hematologic malignancies. Unlike most TAAs commonly used in cancer vaccines, OFA/iLRP is not detectably expressed in healthy cells (Barsoum and Schwarzenberger, 2014). OFA/iLRP is expressed as an immature monomer in the embryo during early gestation and induces

maternal immune responses; by mid-to-late gestation, OFA/iLRP is modified into its non-immunogenic, mature dimerized form. The immunogenic form of OFA/iLRP is re-expressed in cancer cells and has been determined to play an important role in metastasis (Castronovo, 1993). Recombinant OFA/iLRP and derived peptide epitopes have been reported to activate CD4+ and CD8+ tumor-specific T cells, making OFA/iLRP a promising cancer vaccine candidate (Rohrer et al., 2006; Siegel et al., 2006). In this study, we generated recombinant M13 phage and synthetic peptide VEL immunogens from a defined OFA/iLRP CTL epitope and from a multi-epitope region. We tested VEL vaccine immunogens' capacity to inhibit tumor growth and metastasis in the aggressive 4T1 triple-negative breast cancer (TNBC) mouse model (Kim et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020; Wang et al., 2020) and analyzed vaccine-induced immune responses.

2. Materials and methods

2.1. Generation of immunogens

H-2Kd-restricted T cell epitope sequences found within the OFA/iLRP Ag have been previously reported (Rohrer et al., 2006); from these, a 43-mer multi-epitope sequence and a 9-mer epitope sequence were selected, see Table 1. It should be noted that the 9-mer sequence is found within the 43-mer sequence. Random mutations were introduced into the sequences: 6 mutations within the 43-mer sequence and 3 mutations within the 9-mer sequence. Mutated residues were randomized, but H-2Kd peptide-binding motifs were respected. In this manner, two VELs were generated in synthetic peptide format: BPO-43 and BPO-9, with theoretical repertoire complexities of 64×10^6 and 8×10^3 , respectively. Wild type (WT) counterparts used to generate VELs were also generated as synthetic peptides, NPO-43 and NPO-9. PGRS, derived from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) PPE family protein PPE15 was generated as an unrelated VEL control Ag containing eight randomly mutated positions in synthetic peptide format (Table 1). Peptides were synthesized by GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA) and Ontores Biotechnologies (Shanghai, China).

The abovementioned OFA/iLRP-derived VELs and WT counterparts were also generated as recombinant M13 phage expressing variant epitopes on the phage major coat protein. Standard molecular biology procedures were used to generate recombinant M13 phage immunogens, as described in our previous work (NoeDominguez-Romero et al., 2014). Corresponding oligonucleotides/DNA fragments (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were used to generate immunogens (mutated triplets are NNK N = G, A, T or C and K = G or T) (Supplementary Table A.1). We generated two recombinant phage VELs, BFO-43 and BFO-9 with complexities of 55,500 and 8505 individual clones, respectively, along with their corresponding WTs, NFO-43 and NFO-9. Thirty-two variants from BFO-9 were randomly selected, rescued, and sequenced for use in proliferation experiments and checked for correct cloning: all clones expressed different epitope variants (Table 2); the same was done for BFO-43, data not shown. An HIV-1-derived 9-mer CTL epitope, B22, was used as a control phage immunogen as well as G5D, a non-related alanine sequence-based VEL; both have been previously described (NoeDominguez-Romero et al., 2014).

2.2. Ethics statement

All animal experiments were carried out under approved protocols from the Animal Care and Use Committee at Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and following recommendations from the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH. Mice were euthanized by CO₂ chamber. All efforts were made to minimize suffering during experiments.

Table 1
Immunogen Sequences.

	Format		
	Recombinant Phage	Synthetic Peptide	Amino acid sequence
Wild-type sequence	NFO-43 NFO-9 BFO-43	NPO-43 NPO-9 BPO-43	INLKRTWEKLLLAARAIVAIAENPADVSVISSRNTGQRAVLKFA KRTWEKLLL INLKRXWXKLXLAARAIVAIAENPADVSVISSRNXXGXRVLKFA ^a
Variable Epitope Library (VEL)	BFO-9	BPO-9 PGRS	KRXWXKLXL ^a LFXNGGAGGQGGXGGXGGXGGXGGXGMAXGPAGGTGGIGXIGGIC ^{a,b}
Epitope	G5D B22		A(G/F)PXXXXX(L/M) ^{a,d} ALQRLFETC ^c

^a X – any of 20 natural amino acids.^b Mtb-derived VEL used as a non-related immunogen.^c HIV-1-derived epitope used as a non-related immunogen.^d VEL used as a non-related antigen.**Table 2**
Sequences of OFA/iLRP-derived WT epitope and epitope variants.

Wild-type epitope	K	R	T	W	E	K	L	L	L
Epitope Library	K	R	X	W	X	K	L	X	L
Epitope Variants									
1	–	–	C	–	F	–	–	F	–
2	–	–	P	–	L	–	–	P	–
3	–	–	P	–	P	–	–	L	–
4	–	–	K	–	E	–	–	K	–
5	–	–	Q	–	R	–	–	I	–
6	–	–	A	–	N	–	–	A	–
7	–	–	W	–	I	–	–	S	–
8	–	–	K	–	K	–	–	K	–
9	–	–	T	–	P	–	–	P	–
10	–	–	R	–	Q	–	–	H	–
11	–	–	Q	–	K	–	–	K	–
12	–	–	S	–	E	–	–	Y	–
13	–	–	L	–	E	–	–	R	–
14	–	–	Q	–	E	–	–	N	–
15	–	–	R	–	P	–	–	G	–
16	–	–	Q	–	Q	–	–	L	–
17	–	–	E	–	G	–	–	N	–
18	–	–	R	–	E	–	–	E	–
19	–	–	R	–	P	–	–	Q	–
20	–	–	S	–	A	–	–	A	–
21	–	–	C	–	G	–	–	I	–
22	–	–	P	–	T	–	–	Q	–
23	–	–	V	–	F	–	–	V	–
24	–	–	V	–	F	–	–	F	–
25	–	–	E	–	Q	–	–	G	–
26	–	–	G	–	K	–	–	T	–
27	–	–	K	–	H	–	–	K	–
28	–	–	V	–	F	–	–	F	–
29	–	–	W	–	K	–	–	Y	–
30	–	–	P	–	P	–	–	P	–
31	–	–	K	–	G	–	–	Q	–
32	–	–	L	–	G	–	–	Q	–
Amino acid frequencies			13/32		13/32			16/32	

X- any of 20 natural amino acids.

2.3. 4T1 tumor model

4T1 cells (American Type Culture Collection) were maintained in RPMI-1640 medium, supplemented with 10 % FBS, penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL), and fungizone (0.75 mg/mL), and cultured in a humidified incubator at 37 °C/5 % CO₂. Tumors were established by subcutaneously (s.c.) injecting 10⁴ viable 4T1 cells in 60 µL PBS into the right mammary fat pad. Primary tumors were detectable around nine days after tumor challenge. Tumor growth measurements were taken every 3 days, and tumor area was calculated as length (mm) x width (mm) using digital Vernier calipers. The experimental endpoint was established as day 30 post-tumor challenge.

2.4. Therapeutic treatment with VELs or wild-type immunogens

5 to 6-week-old female BALB/c mice were used in groups of 5–8. All experiments were repeated at least four times with comparable results. Immunizations were performed on day 5 post-tumor challenge by s.c. administration of 180 µg of synthetic peptide plus 180 µg of poly-inosinic:polycytidylic acid adjuvant (Poly (I:C), Sigma-Aldrich) in 100 µL phosphate-buffered solution (PBS). Phage immunogens were administered intravenously (1 × 10¹² phage particles suspended in 200 µL PBS). Control groups received the same dose of either synthetic peptide or recombinant phage. All animals received a single dose of an immunogen. Lung metastases were analyzed by counting macro-metastatic lesions on day 30 post-tumor challenge.

2.5. Cell proliferation assay and flow cytometry

Different experimental conditions were implemented to evaluate the immunogenicity and specificity of VEL-induced immune responses. In the Immunization setting, splenocytes from non-tumor-bearing mice were harvested on day 75 post-immunization. In the prophylactic setting, mice were challenged with 4T1 cells 60 days post-immunization, and splenocytes were collected on day 15 post-tumor challenge. In the therapeutic setting, mice were immunized on day 5 post-tumor challenge, and splenocytes were collected on day 15 post-tumor challenge. Splenocytes from control groups were used to explore natural immune responses using naïve and 4T1 challenged mice; the latter were collected on day 15 post-tumor challenge. Splenocytes were obtained from 3 mice per group and were analyzed by flow cytometry using standard protocols as described in our previous studies (Servín-Blanco et al., 2018; Domínguez-Romero et al., 2020). Briefly, cells were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 1 % sodium pyruvate, 1 % nonessential amino acids, and 1 % 2-beta-mercaptoethanol, then washed twice with PBS and resuspended again in RPMI-1640 at a concentration of 5 × 10⁷ cells/mL. Cells were stained with 1.2 µM CFSE (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature, washed twice with 10 mL PBS 5 % FBS at 4 °C, and cultured in a 96-well flat-bottom plate (2.5 × 10⁵ cells/well). Cells were stimulated with 3 × 10⁹ recombinant phage particles/well, corresponding to BFO-9 variants for 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ incubator. Surface staining was carried out using anti-CD3 APC-eFluor780 (clone 145-2C11, ThermoFisher Scientific) and anti-CD8 PE (clone 53-6.7) (BioLegend, San Diego, CA, USA) in 1 % FBS PBS for 30 min at room temperature in the dark, then cells were fixed with 1 % paraformaldehyde. Dead cells were excluded by 7-amino-actinomycin D (Tonbo Biosciences). Samples were acquired on an Attune Flow Cytometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), and results were analyzed using FlowJo free trial (BD, San Jose, CA, USA); at least 100,000 total events were collected. The gating strategy for the setting can be found in Supplementary Fig. C.1.

To evaluate responses of CD4+IFN-γ+ and CD8+IFN-γ+ T cells *in vitro*, mice were immunized with a synthetic peptide corresponding to

VELs and WT counterparts on day 5 post-tumor challenge, and splenocytes were collected on day 15 post-tumor challenge. We stimulated splenocytes with 3×10^9 recombinant phage particles/well corresponding to VELs, WT counterparts and controls for 72 h. During the final 5 h of incubation, cells were treated with monensin 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ (2 μM) (Sigma-Aldrich). Surface staining was carried out using anti-CD3 APC-eFluor780 (clone 145-2C11, ThermoFisher Scientific), anti-CD4 APC (clone RM4-5, ThermoFisher Scientific) and anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BioLegend) monoclonal antibodies for 30 min at room temperature in the dark; cells were then fixed with 1 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature, and then washed. After permeabilization with the permeabilization buffer solution (Tonbo), anti-IFN- γ PE-Cy7 (clone XMG1.2, BioLegend) was added for 30 min in the dark. Samples were acquired on an Attune Flow Cytometer (ThermoFisher), and results were analyzed using FlowJo free trial (BD); at least 100,000 total events were collected.

2.6. Cell phenotyping by flow cytometry in therapeutic setting

Cell phenotype markers were used to analyze CD3+CD8+IFN- γ +, CD3+CD8+Ly6C+, CD8+GranzymeB+, CD8+Perforin + and CD4+CD25+FoxP3+ T cell populations and the Granulocytic-MDSC population (G-MDSC) CD11b + Ly6ClowLy6G+. Spleens, lungs and tumors were pooled from 3 immunized mice on day 30 post-tumor challenge to prepare single-cell suspensions. 2.5×10^5 cells/well were stained according to manufacturer's instructions with a panel of fluorescent labeled monoclonal antibodies: anti-CD3 APC-eFluor780 (clone 145-2C11, ThermoFisher Scientific), anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BioLegend), anti-Ly6C PE-Cy7 (clone HK1.4, ThermoFisher Scientific), anti-IFN- γ PE-Cy7 (clone XMG1.2, BioLegend), anti-IFN- γ PerCP-Cy5.5 (clone XMG1.2, BioLegend), anti-Granzyme B FITC (clone NGZB, ThermoFisher Scientific), anti-Perforin APC (clone S16009A, BioLegend), anti-CD11b AlexaFluor488 (clone M1/70, BioLegend), anti-Ly6G PE (clone RB6-8C5, ThermoFisher Scientific), anti-CD3 PE-Cy7 (clone 145-2C11, Tonbo Biosciences), anti-CD4 APC (clone RM4-5, BioLegend), anti-CD25 APC-eFluor780 (clone PC61.5, ThermoFisher Scientific), anti-FoxP3 PE (clone 3G3, ThermoFisher Scientific). Ghost Dye Violet 450 or 7AAD were used as viability dyes.

For intracellular staining (ICS), cells were treated with monensin 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ (2 μM) (Sigma-Aldrich) for at least 4 h. Cells were first surface stained with corresponding monoclonal antibodies, fixed with 1 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature, and then permeabilized with permeabilization buffer solution (Tonbo) before intracellular staining. Foxp3 staining was performed with the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit (Tonbo Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired on an Attune Flow Cytometer (ThermoFisher), and results were analyzed using FlowJo free trial (BD). The gating strategy for the setting can be found in Supplementary Figs. D.1, E.1, and F.1.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, CA, USA). Tumor growth curves were analyzed with a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements and Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons ($n = 10$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). All results are expressed as mean \pm SEM. Experiments were repeated at least three times with comparable results. Before statistical analyses, lung metastatic lesion data were converted into logarithmic form to obtain normal distribution; data were analyzed using a one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons. IFN- γ -producing CD4+ and CD8+ T cell assay data (%) were analyzed with a two-way ANOVA for repeated measurements and Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons. All flow cytometry analysis graphs were calculated as the number of cells/g of tissue. Cell numbers from 4T1 control mice were considered baseline,

and X-fold changes were calculated from these. Data are expressed as X-fold change as mean \pm SD, $n = 4$. Differences were considered significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. All experiments were repeated at least once with comparable results.

3. Results

3.1. Immunogens

We generated two OFA/iLRP-derived VELs synthetic peptide (BPO-43 and BPO-9) and recombinant M13 phage formats (BFO-43 and BFO-9) (Table 1); calculated complexities of phage libraries were 55,500 clones for BFO-43 and 8505 clones for BFO-9. Analysis of the BFO-9 Ag panel (Table 2) shows that 13–16 different amino acids are present at mutated positions in 32 epitope variants, indicating the acceptable distribution of introduced mutations and epitope diversity as we have observed in our previous studies (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020).

3.2. Therapeutic effects in mice vaccinated with VELs

Tumor-bearing BALB/c mice were treated with VEL immunogens or WT sequences, as shown in Fig. 1A. Treatment with VEL immunogens resulted in statistically significant tumor growth reduction compared to control groups, particularly when used in synthetic peptide format (Fig. 1B–E). In addition, while no statistically significant differences were found, we observed a tendency towards tumor weight reduction between VEL- and wild-type-treated mice (Supplementary Fig. A.1), reflecting data obtained from tumor growth inhibition.

As a follow-up, we analyzed metastatic burden and found a statistically significant reduction in VEL-treated mice (Fig. 1F, G), specifically between BFO-9 and its WT counterpart, NFO-9, or controls (Fig. 1G). Furthermore, when we compared BFO-43 and BFO-9, we observed more significant metastasis reduction in BFO-9-treated mice; surprisingly, this was not observed when used in synthetic peptide format (BPO-43 vs BPO-9), but both VELs reached similar levels of metastases reduction. Interestingly, the metastatic index showed the same results as the macrometastases described above (data not shown). Collectively, these results demonstrate the relevance of VEL vaccines in terms of tumor and metastasis inhibition.

3.3. VEL-induced cellular immune responses

To investigate whether the observed therapeutic effects induced by VEL immunogens were mediated by cellular immune responses, we determined the presence of Ag-specific IFN- γ -producing CD8+ and CD4+ T lymphocytes in the spleens of immunized mice. To examine this, we stimulated splenocytes from VEL- and WT-treated mice *in vitro* with phage immunogens. As shown in Fig. 2C and D, higher percentages of IFN- γ -producing T cells were detected when stimulating splenocytes from BPO-9-immunized mice with BFO-43 and BFO-9 Ags, while cells from NPO-9-vaccinated mice showed minimal response to Ag stimulation. By contrast, no differences were observed in cells obtained from BPO-43- and NPO-43-immunized groups. Accordingly, we decided to evaluate further immune responses induced during therapy with BPO-9. Thus, 24 epitope variants randomly selected from the BFO-9 library were tested with spleen-derived CD8+ T cells obtained from tumor-bearing and non-tumor-bearing mice immunized with BPO-9 or WT NPO-9. We conducted a long-term prophylaxis experiment (Fig. 3B; tumor challenge 60 days post-immunization) to measure the immunogenic profiles in tumor-challenged versus unchallenged (Fig. 3A) mice immunized with BPO-9 or WT NPO-9. We found greater immunogenicity of the VEL: 80 % of epitope variants were recognized by CD8+ T cells from the BPO-9-immunized group, while only 20 % of variants were recognized by the cells from NPO-9-immunized mice (Fig. 3A). Despite overall lower proliferation levels after tumor challenge in the

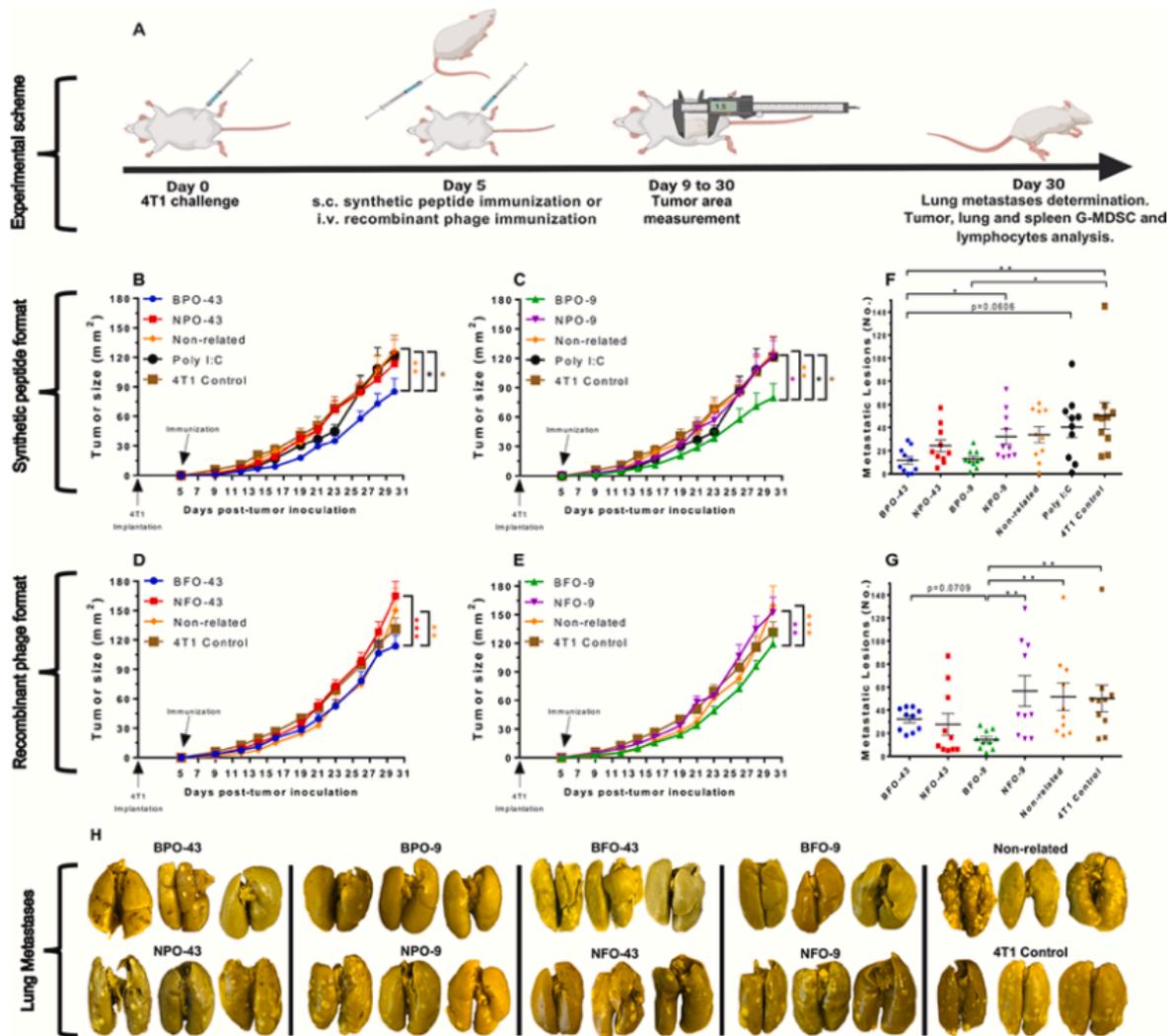


Fig. 1. Therapeutic vaccination of mice with VELs. A) Experimental scheme for treatment. B-C) Tumor growth in mice treated with synthetic peptide VELs; PGRS was used as a non-related control VEL. D-E) Tumor growth in mice treated with recombinant M13 phage VELs; B22 was used as a phage expressing a non-related epitope. Lung macrometastases were analyzed at day 30 for (F) synthetic peptide VELs- and (G) phage VELs-treated mice. H) Representative images of lung macrometastases. Tumor areas and lung macrometastases are presented as mean \pm SEM; $n = 10$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Tumor areas were analyzed using a two-way ANOVA for repeated measurements and Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. Lung macrometastases were analyzed using a one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. All experiments were repeated at least three times with comparable results.

prophylactic setting, due to strong tumor-induced inhibition, a similar tendency was observed: preferential recognition of variants by CD8+ T cells derived from BPO-9-immunized mice compared to NPO-9-immunized mice (Fig. 3B). In the therapeutic setting, we observed that 65 % of the tested variants induced CD8+ T cell proliferation in splenocytes derived from BPO-9-treated mice, compared to 35 % in samples from NPO-9-treated mice, and interestingly, several variants were better at stimulating CD8+ T cells from NPO-9-treated mice than those from BPO-9-treated mice (Fig. 3C). These results indicate the overall higher immunogenicity of VEL immunogens over their WT counterparts, which coincides with our previously reported data (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Domínguez-Romero et al., 2020). Finally, we explored natural immune responses in naïve mice and after disease onset to evaluate changes in the epitope recognition landscape using the same panel of variant epitopes. We found that 15 variants preferentially stimulated CD8+ T cells derived from tumor-challenged mice (4T1 control), 8 induced stronger proliferation of CD8+ T cells obtained from naïve mice compared with mice from the 4T1-challenged group, and NFO-9 antigen equally stimulated CD8+ T cells from both groups (Fig. 3D).

3.4. VELs induce a high frequency of effector and a low frequency of immunosuppressive populations

Our findings up to now led us to consider a strong presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in VEL-treated mice, as these are associated with greater antitumor immune responses. Thus, tumor tissue sections were obtained from VEL-treated mice for immunofluorescence processing and analysis by multiparametric flow cytometry to identify TILs at day 30 post-tumor challenge. Strikingly, CD8+ TILs increased 6.8-fold and 4.8-fold in the BPO-43 and BPO-9 treatment groups, respectively, compared to control groups, whereas the WT-treated group had lower values (Fig. 2A); this observation was evidenced by immunofluorescence (data not shown), where VEL-treated mice showed higher CD8+ TIL presence. Results for CD4+ TILs were similar; a 5.3-fold increase was observed in BPO-43- and BPO-9-immunized mice. In WT-treated groups, a 2-fold increase and slight decrease were observed in NPO-43- and NPO-9-immunized mice, respectively, compared to control groups (Fig. 2B). Additionally, we evaluated the presence of CD8+Ly6C + effector T lymphocytes, reported to have antitumor properties (Piranlioglu et al., 2019). We found a significant increase in

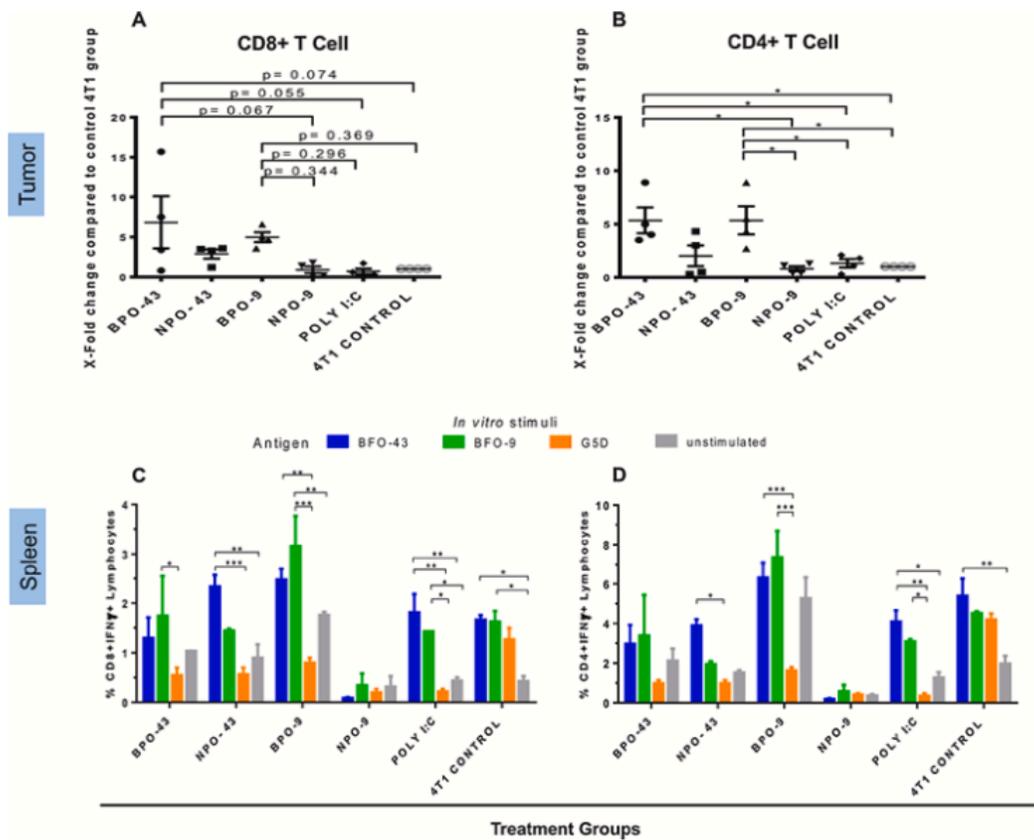


Fig. 2. VEL-induced cellular immune responses. (A) and (B): CD8+ (A) and CD4+ (B) TILs identified in VEL-, WT-, adjuvant-treated mice, or tumor control mice. Mice were immunized on day 5 post-tumor challenge and sacrificed on day 30 post-tumor challenge. Flow cytometry results showing X-fold change in CD8+ and CD4+ T cell numbers within tumors, compared with 4T1 control. X-fold changes are presented as mean ± SEM. Each point represents a pool of three different tumors from four independent experiments; n = 4; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. One-way ANOVA for repeated measurements and Tukey’s post-hoc test for multiple comparisons were performed. (C) and (D): IFN-γ+ T cell assays from tumor-bearing mice immunized with OFA/iLRP-derived VELs and stimulated in vitro with phage Ags: BFO-43, BFO-9, and G5D. Grey bars – unstimulated cells. Mice were immunized on day 5 post-tumor challenge, and splenocytes were collected on day 15 post-tumor challenge. Results (%) for CD8+ (C) and CD4+ (D) IFN-γ-producing cells out of total CD3+ cell values. Each point represents cells from three different mice; at least 3 independent experiments were carried out. % of IFN-γ+ cells are presented as mean ± SEM and were analyzed using a two-way ANOVA for repeated measurements and Tukey’s post-hoc test for multiple comparisons; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

the number of effector T cells in the tumors of VEL-treated mice (Fig. 4A), consistent with our previous observations for CD8+ T lymphocytes (Fig. 2A). Interestingly, lung samples from NPO-43-treated mice demonstrated an increase in effector T cells compared to its VEL counterpart (Fig. 4B); however, lower lymphocyte numbers did not affect metastasis inhibition in BPO-43-treated mice.

G-MDSCs and Tregs are potent inhibitors of antitumor immune responses and promote tumor progression; therefore, it is imperative to determine their presence during therapy in cancer. We analyzed lung and tumor samples, which are important sites for active immune responses within the tumor model used. Analysis of lung and tumor samples revealed lower G-MDSCs numbers in VEL-treated mice (Fig. 4A–B). These data, along with observations in effector T cells in tumors and lungs, may explain more significant metastasis reduction in VEL-treated animals. Treg numbers were decreased in the tumors of VEL-treated mice; however, this cell population increased in the lungs of BPO-43-treated mice, which may contribute to immunomodulation by responding effector T cells (Fig. 4B).

We further analyzed the effector CD8+ T cell population by measuring *ex-vivo* IFN-γ, granzyme B and perforin production within tumors and spleens of treated mice (Fig. 5). We observed significantly higher levels of CD8+IFN-γ+ cells in the tumors from both BPO-43- and BPO-9-treated mice and a significant increase in the numbers of granzyme B+ cells in tumors from BPO-43-immunized mice (Fig. 5A). In the case of spleen cells, significantly increased levels of these three populations of T cells were observed only in samples from mice vaccinated with BPO-9 (Fig. 5B). The presence of CTLs with varying phenotypes may be related to the overall reduction in G-MDSCs and Tregs, thus permitting durable cellular responses by immunization with VELs.

4. Discussion

Currently, there is a trend towards personalized immunotherapy focused on targeting Neo-Ags. It has even been suggested that harnessing Neo-Ag specific T cells might represent the final common pathway for all potential immunotherapy modalities to achieve antitumor responses (De Mattos-Arruda et al., 2020); however, the consensus, up to now, is that immunotherapy does not provide benefits over conventional therapy. For instance, lower efficacy of ICI immunotherapy is frequently observed in patients (Fares et al., 2019) with low mutational burden tumors (Kim et al., 2019), such as TNBC in humans and in the analogous 4T1 tumor model (Schrörs et al., 2020). The final outcome of tumor-immune interactions is influenced by complex evasion mechanisms, which govern the strength and timing of anticancer responses (Schreiber et al., 2011; Chen and Mellman, 2017; Van den Eynden et al., 2019). To date, no proposed cancer vaccine has taken immune evasion or antigenic variability into serious consideration. Therefore, it is of paramount importance to restructure Ags in order to generate immune responses similar to those which are naturally produced, but in a more efficient time frame: immune responses must stay ahead of antigenic variability. In this manner, VEL immunogens directly address antigenic variability, plus they offer an alternative and universal approach to generate vaccines against antigenically variable pathogens and cancer (Servín-Blanco et al., 2016). We envision that the simultaneous presentation of a large number of epitope variants by VEL immunogens will generate the most extensive repertoire of effector T cells; this will enable us to directly target ITH and address antigenic variability.

In the present study, we evidenced the effectiveness of our innovative VEL vaccine platform. On this occasion, we utilized two OFA/iLRP-derived epitopes and demonstrated antitumor effects in a TNBC murine

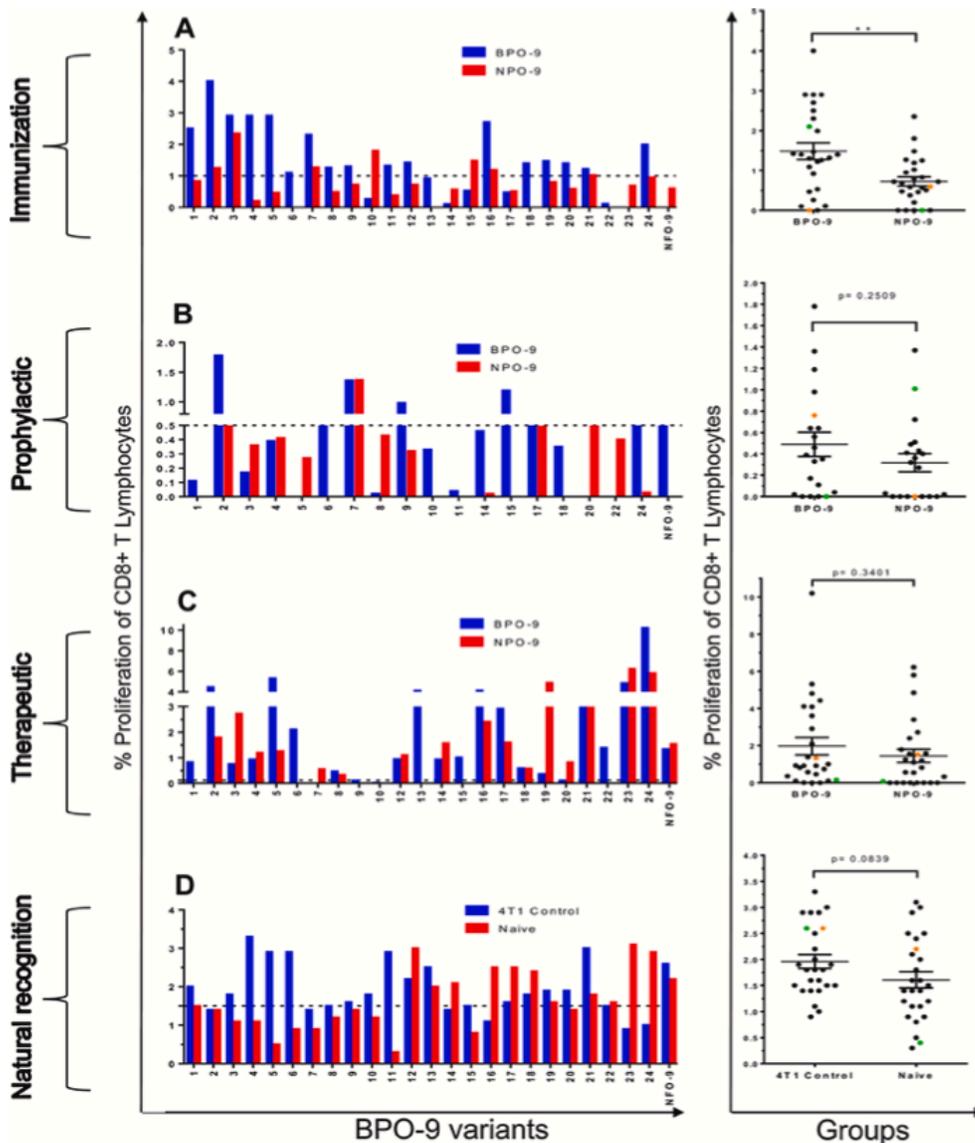


Fig. 3. Epitope-specific responses of CD8⁺ T lymphocytes. A panel of 24 randomly selected phage variants derived from BFO-9 were used to stimulate spleen-derived CD8⁺ cells in proliferation assays. A) *in vitro* stimulation of CD8⁺ T cells from non-tumor-bearing BPO-9- or NPO-9-immunized mice, 75 days after immunization (Immunization). B) *in vitro* stimulation of CD8⁺ T cells from BPO-9- or NPO-9-immunized mice 15 days post-tumor-challenge (60 days after priming) (Prophylactic setting). C) CD8⁺ T cells from tumor-bearing BPO-9- or NPO-9-immunized mice obtained 15 days post-tumor challenge, mice were immunized 5 days post-tumor challenge (Therapeutic setting). D) stimulation of CD8⁺ T cells from naive mice or from untreated tumor-bearing mice obtained 15 days post-tumor-challenge (Natural Recognition). In the right panels each point represents an individual epitope variant used as an Ag in CD8⁺ T cell proliferation assays; CD8⁺ T cell proliferation data (%) are presented as mean \pm SEM; data were analyzed using Mann-Whitney two-tailed t test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The orange point represents NFO-9 wild-type Ag, and the green point represents non-related Ag B22 (A–D). Data were obtained after subtraction of negative control values for each experimental setting. The dotted line indicates the average in cell proliferation obtained when stimulating both experimental groups with the non-related Ag. One experiment was performed. Naive mice are defined as the non-immunized and non-tumor bearing.

model. We generated VELs based on OFA/iLRP-derived WT epitope (NPO-9) and larger epitopic region (NPO-43) that were identified by epitope mapping previously (Rohrer et al., 2006). Interestingly, although these epitopes were reported as moderately Kd-binding peptides, one epitope from NPO-43, RNTGQRAVL, showed inhibition of tumor growth and lung metastases (Rohrer et al., 2006), and another one (KLLLAARAI) was able to stimulate T cells from cancer patients (Siegel et al., 2006), indicating that MHC-binding capacity does not necessarily interfere with pMHC-TCR interactions and effector functions of T cells (Bentzen et al., 2018). It is worth mentioning here that there are previous reports describing the application of another member of oncofetal antigens, namely OFA 5T4, a surface molecule shared between human trophoblast and cancer cells, as a tumor-targeted superantigen, antibody-drug conjugate, vaccine candidate, or as a target for chimeric Ag receptor T cells (Stern and Harrop, 2017). Here, we proved that BPO-43 and BPO-9 VELs, bearing combinatorial libraries of 43-mer and 9-mer mutant epitopes/peptides, respectively, can significantly inhibit tumor growth and metastasis after a single immunization (Fig. 1B–E, F–G). The antitumor effects induced by our treatments validate the VEL strategy as a strong candidate for cancer immunotherapy. The poorly immunogenic 4T1 tumor model is characterized by rapid growth, spontaneous metastasis and ICI treatment resistance; these

characteristics are also observed in advanced stage IV human breast cancers (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001; Wang et al., 2020). It has been reported that ICI immunotherapy could not inhibit tumor growth in 4T1 tumor-bearing mice (Kim et al., 2014). In the same study, strong but temporary tumor growth inhibition and metastasis reduction were documented in surviving mice; however, only after four doses of a 4-component mixture (Kim et al., 2014). In light of this, we demonstrated VEL-induced antitumor effects after just a single dose, in contrast with standard treatment protocols, which use several interventions to control disease progression. We have previously reported the use of different TAA-derived CTL epitopes to generate single dose VEL monotherapy immunogens in the 4T1 tumor model and obtained similar results, thus demonstrating the relevance of the VEL concept and its adaptability (NoeDominguez-Romero et al., 2014; Servín-Blanco et al., 2018; Domínguez-Romero et al., 2020).

We evaluated two VELs, (i) a minimal 9-mer CTL epitope and (ii) a 43-mer multiepitope sequence. We decided to test the 43-mer VEL immunogen to favor CD4⁺ T cell responses, crucial for efficient CTL responses. The diverse epitope repertoire found within BPO-43 possibly increases the breadth and magnitude of T cell responses to promote a more efficient elimination of tumor cells. In line with the previous, a study reported by Kreiter et al. (2015) showed that vaccination with a

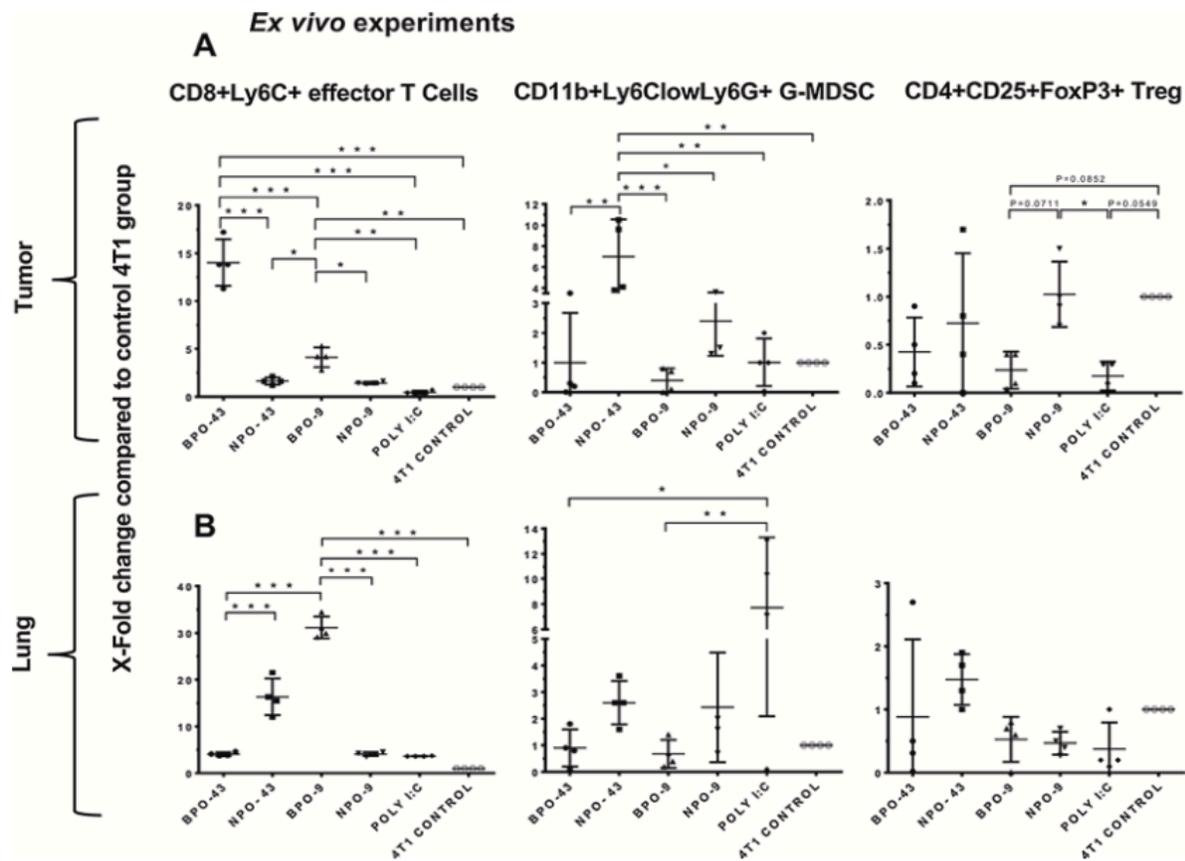


Fig. 4. VEL-induced effector/suppressor/regulatory cell modulation during therapeutic treatment. Ex vivo analysis of treatment response within tumors (A) and lungs (B) of mice. Flow cytometry results showing X-fold change in the numbers of effectors T cells, G-MDSCs and Tregs within tumors and lungs, compared with tissues from 4T1 control. X-fold changes are presented as mean \pm SD. Each point represents a pool of three different tumors and lungs from four independent experiments; n = 4; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. One-way ANOVA for repeated measurements and Tukey's post-hoc test for multiple comparisons were performed.

larger neo-epitope peptide sequence increases CD4+ T cell responses, reshapes the tumor microenvironment, and induces CTL responses. It is worth mentioning that vaccination with 9-mer BPO-9 induced high levels of CD4+ TILs and CD4+IFN- γ + cells in the spleen, probably due to the very nature of BPO-9 bearing the mixture of thousands of epitope variants. Interestingly, Gross and collaborators showed the capability of short peptides (9- or 10-mer) to activate CD4+ T cells in vaccination trial in cancer patients (Gross et al., 2016). Also, despite the absence of T-helper epitopes, we have shown previously that 9-mer VELs can induce CD8+ and CD4+ T cell responses and moderately self-reactive T cells that overlap with specific immune responses with antitumor properties (NoeDominguez-Romero et al., 2014).

Interestingly, we observed significant metastasis reduction when using VEL immunogens in a synthetic peptide or recombinant phage format (Fig. 1F–G), resulting in an increase in the breadth of CD8+ and CD4+ T cell repertoires, which ultimately foster desirable antitumor responses (Figs. 2 and 4). Also, vaccination with BPO-43 and BPO-9 induces the reduction of G-MDSCs in tumors compared with samples from the NPO-43 group, where the increase of these cells was observed. Similarly, we found a decrease of G-MDSCs in the lungs of mice vaccinated with VELs compared with mice treated with adjuvant (Fig. 4). On the other hand, we have not detected a significant decrease of Treg cells in tumors or lungs of vaccinated mice. Interestingly, MDSC inhibition has been shown to improve disease outcome in murine tumor models (Markowitz et al., 2013). Likewise, it has been reported that G-MDSC depletion in the 4T1 tumor model reduces metastatic burden (Ouzounova et al., 2017). Furthermore, Piranlioglu and collaborators showed that adoptive transfer of G-MDSCs isolated from 4T1 tumor-bearing

mice induces metastasis by suppressing CD8+ T cells in EMT6 tumor-primed mice (Piranlioglu et al., 2019). In general, these findings suggest that decreasing G-MDSC infiltration in tumors and lungs may account for a reduction in tumor growth and metastasis, respectively.

Ultimately, any therapeutic cancer vaccine should induce CTL responses against tumors; therefore, IFN- γ production by T cells is pivotal to activate anti-cancer immunity. In our effort to elucidate the matter, we demonstrated that IFN- γ production by CD4+ and CD8+ T cells, obtained from BPO-43-treated mice, was more significant in response to BFO-9 variants than to the initially used BFO-43 immunogen. As we expected, spleen-derived CD4+IFN- γ + and CD8+IFN- γ + T cells obtained from BPO-9-treated mice showed stronger recognition towards their own individual Ags, compared to the larger BPO-43 sequence. This is a clear indication of the greater immunogenicity of BPO-9 over BPO-43, even though the 9-mer WT epitope is found within the 43-mer WT epitope (Fig. 2C–D).

We have shown that recognition of 24 mutated epitope variants by CD8+ T cells derived from BPO-9-immunized mice was greater when compared to NPO-9-immunized mice, reflecting the superior immunogenicity of BPO-9 over the WT NPO-9 (Fig. 3A; 19 vs 5 variants). These data coincide with our previous reports using VEL immunogens based on HIV-1- and survivin-derived 9-mer CTL epitopes and reflect a general feature intrinsic to VEL-based immunogens (Pedroza-Roldan et al., 2009; NoeDominguez-Romero et al., 2014). Broad coverage of potential Ag targets by VEL-induced TCR repertoires may have critical importance for vaccine efficacy since the antigenic landscape of tumors is highly complex and largely unpredictable. It has been reported that non-mutated tumor neoepitopes, bearing leader peptide sequences

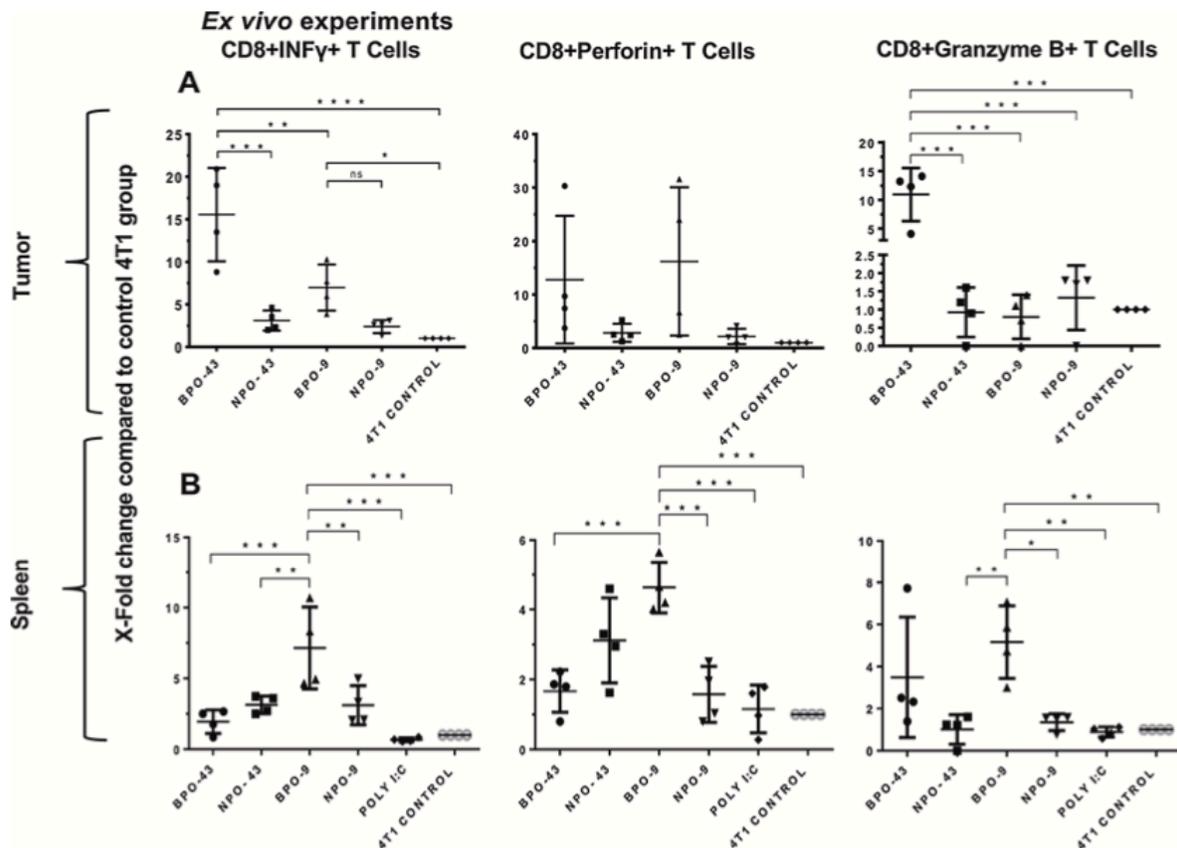


Fig. 5. Phenotypic analysis of CD8⁺ T cells derived from VEL-treated mice. Ex vivo analysis of IFN- γ , granzyme B- and perforin-producing CD8⁺ T cells found within tumors (A) and spleens (B). Lymphocyte numbers from the 4T1 control were considered baseline, and X-fold changes were calculated with respect to the control. X-fold changes are presented as mean \pm SD, each point represents a pool of three different tumors or spleens from four independent experiments; $n = 4$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. One-way ANOVA for repeated measurements and Tukey's post-hoc test for multiple comparisons were performed.

processed by peptidases (independent of classical proteasomal processing) can be recognized by the immune system (Leclerc et al., 2019); furthermore, even WT cancer-related Ags might be targeted by vaccination (Sahin et al., 2020).

Our data from both prophylactic and therapeutic immunization studies indicate that in the disease state, epitope recognition is altered, leading to T cell proliferation inhibition for a fraction of BPO-9 variants (Fig. 3). This phenomenon may be due to protective CTL responses induced by immunization with BPO-9, which might be detrimental to the tumor. However, tumor immunosuppression did not interfere with the efficacy of VEL vaccines. Tumor-induced suppression of T cell responses during therapy could also be attributed to dynamic changes within the tumor immunopeptidome and selective pressure by tumor-specific CTL responses, resulting in gain, loss, or downregulation of targeted Ags (Matsushita et al., 2012; Dharmaraj et al., 2019). Importantly, there is evidence in human cancers that Neo-Ag recognition by T cells or TILs can be lost/gained due to selective pressure during ACT, or ICI treatment (Verdegaal et al., 2016; Anagnostou et al., 2017; Riaz et al., 2017). Furthermore, dynamic changes and selective loss of high-quality Neo-Ag clones on metastatic progression have been reported, suggesting Neo-Ag immunoeediting (Balachandran et al., 2017). Recent multidimensional analyses of carcinoma samples from a large cohort of patients showed clear signs of immunoeediting and tumor immune escape during cancer evolution (Rosenthal et al., 2019). The complex picture of tumor-immune interactions may be complemented by studies showing that mutated epitopes, which are poorly bound to MHC class I and class II molecules, are positively selected during tumorigenesis; this indicates that MHC-restricted immunoeediting shapes the cancer mutational landscape (Marty et al., 2017, 2018). Despite

variability in the epitope recognition landscape, our T cell studies indicate that OFA/iLRP-derived VEL immunogens can induce a diverse repertoire of tumor/Ag-specific T cells.

Interestingly, the incorporation of OFA/iLRP-derived epitopes/peptides into peptide nanoclusters (PNC) to improve immunogenicity, which resulted in significant peptide presentation by DCs, higher retention at the intradermal injection site, and passive diffusion to lymph nodes, has been described (Tsoras and Champion, 2018). In general, our findings provide further evidence that VEL-based immunogens merit in-depth studies to enhance antitumor effects by using TAA- or Neo-Ag-based VELs and different delivery systems or vaccine adjuvants (Lynn et al., 2020; Shemesh et al., 2021).

5. Conclusions

We reported the construction of several OFA/iLRP-derived VEL immunogens in synthetic peptide and recombinant M13 phage formats, based on a 9-mer (3 mutated residues) and 43-mer (6 mutated residues) epitope/peptide sequences, bearing a large number of epitope variants. VEL immunogens induced broad T cell repertoires and antitumor responses (tumor and lung metastasis inhibition) after a single immunization. Indeed, the VEL concept has proven to be a viable immunotherapy alternative. VEL immunogens, composed of large combinatorial libraries of epitope variants, are qualitatively different from any immunotherapy approach currently available, and most importantly, they directly target antigenic variability and ITH.

CRediT authorship contribution statement

Fernando Martínez-Cortés: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Rodolfo Servín-Blanco:** Methodology, Validation. **Allan Noé Domínguez-Romero:** Validation, Formal analysis, Visualization. **María Elena Munguía:** Methodology, Investigation. **Jesus Guzman Valle:** Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Josué Odales:** Validation, Writing - review & editing. **Goar Gevorkian:** Validation, Investigation, Writing - review & editing. **Karen Manoutcharian:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgements

Funding was provided by PAPIIT-UNAM (IN205216) and CONACyT (N283036), MEXICO, to KM. Fernando Martínez-Cortés is a recipient of a scholarship from CONACyT (582552) and Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico. RSB and JO are recipients of scholarships from CONACyT and Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM; ANDR and JGV are recipients of scholarships from CONACyT and Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM. Authors thank Patricia de la Torre for DNA sequencing; LabNalCit-UNAM (CONACYT) for the technical support for the acquisition (and/or sorting) of flow cytometry samples and Unidad de Modelos Biológicos (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for animal care.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.08.013>.

References

- Anagnostou, V., Smith, K.N., Forde, P.M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., et al., 2017. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 7, 264–276. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0828>.
- Balachandran, V.P., Łuksza, M., Zhao, J.N., Makarov, V., Moral, J.A., Remark, R., et al., 2017. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature* 551, 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature24462>.
- Barsoum, A.L., Schwarzenberger, P.O., 2014. Oncofetal antigen/immature laminin receptor protein in pregnancy and cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19, 393–406. <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0203-7>.
- Bentzen, A.K., Such, L., Jensen, K.K., Marquard, A.M., Jessen, L.E., Miller, N.J., et al., 2018. T cell receptor fingerprinting enables in-depth characterization of the interactions governing recognition of peptide-MHC complexes. *Nat. Biotechnol.* 36, 1191–1196. <https://doi.org/10.1038/nbt.4303>.
- Cafri, G., Gartner, J.J., Zaks, T., Hopson, K., Levin, N., Paria, B.C., et al., 2020. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J. Clin. Invest.* 130, 5976–5988. <https://doi.org/10.1172/JCI134915>.
- Castronovo, V., 1993. Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* 13, 1–30. PMID: 8407208.
- Charles-Niño, C., Pedroza-Roldan, C., Viveros, M., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., 2011. Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody-response. *Vaccine* 29, 5313–5332. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.007>.
- Chen, D.S., Mellman, I., 2017. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321–330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>.
- De Mattos-Arruda, L., Vazquez, M., Finotello, F., Lepore, R., Porta, E., et al., 2020. Neoantigen prediction and computational perspectives towards clinical benefit: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann. Oncol.* 31, 978–990. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.05.008>.
- Dersh, D., Holly, J., Yewdell, J.W., 2021. A few good peptides: MHC class I-based cancer immunosurveillance and immunoevasion. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 116–128. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0390-6>.
- Dharmaraj, N., Piotrowski, S.L., Huang, C., Newton, J.M., Golfman, L.S., Hanoteau, A., et al., 2019. Anti-tumor immunity induced by ectopic expression of viral antigens is transient and limited by immune escape. *Oncoimmunology* 8, e1568809. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1568809>.
- Domínguez-Romero, A.N., Martínez-Cortés, F., Munguía, M.E., Odales, J., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., 2020. Generation of multipitope cancer vaccines based on large combinatorial libraries of survivin-derived mutant epitopes. *Immunology* 161, 123–138. <https://doi.org/10.1111/imm.13233>.
- Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., Mami-Chouaib, F., 2018. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00014>.
- Fares, C.M., Van Allen, E.M., Drake, C.G., Allison, J.P., Hu-Lieskovan, S., 2019. Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 39, 147–164. https://doi.org/10.1200/EDBK_240837.
- Fennemann, F.L., De Vries, J.M., Figdor, C.G., Verdoes, M., 2019. Attacking tumors from all sides: personalized multiplex vaccines to tackle intratumor heterogeneity. *Front. Immunol.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00824>.
- Gross, S., Lennerz, V., Gallerani, E., Mach, N., Böhm, S., Hess, D., et al., 2016. Short peptide vaccine induces CD4+ t helper cells in patients with different solid cancers. *Cancer Immunol. Res.* 4, 18–25. <https://doi.org/10.1158/2326-6066>.
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., et al., 2019. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0810-y>.
- Keskin, D.B., Anandappa, A.J., Sun, J., Tirosh, I., Mathewson, N.D., Li, S., et al., 2019. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* 565, 234–239. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0792-9>.
- Kim, K., Skora, A.D., Li, Z., Liu, Q., Tam, A.J., Blosser, R.L., et al., 2018. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11774–11779. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410626111>.
- Kim, J.Y., Kronbichler, A., Eisenhut, M., Hong, S.H., Van der Vliet, H.J., Kang, J., et al., 2019. Tumor mutational burden and efficacy of immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Cancers* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers1111798>.
- Kreiter, S., Vormehr, M., Van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., et al., 2015. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520, 692–696. <https://doi.org/10.1038/nature14426>.
- Leclerc, M., Mezquita, L., Guillebot De Nerville, G., Tihy, I., Malenica, I., Chouaib, S., Mami-Chouaib, F., 2019. Recent advances in lung cancer immunotherapy: input of T-cell epitopes associated with impaired peptide processing. *Front. Immunol.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01505>.
- Lynn, G.M., Sedlik, C., Baharom, F., Zhu, Y., Ramirez-Valdez, R.A., Coble, V.L., et al., 2020. Peptide-TLR-7/8a conjugate vaccines chemically programmed for nanoparticle self-assembly enhance CD8 T-cell immunity to tumor antigens. *Nat. Biotechnol.* 38, 320–332. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0390-x>.
- Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., Carson III, W.E., 2013. Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 140, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7>.
- Marty, R., Kaabinejadian, S., Rossell, D., Sliker, M.J., Van de Haar, J., Engin, H.B., et al., 2017. MHC-I genotype restricts the oncogenic mutational landscape. *Cell* 171, 1272–1283. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.050> e15.
- Marty, R., Thompson, W.K., Salem, R.M., Font-Burgada, J., Zanetti, M., Carter, H., 2018. Evolutionary pressure against MHC class II binding cancer mutations. *Cell* 175, 416–428. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.048> e13.
- Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., et al., 2012. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoevasion. *Nature* 482, 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature10755>.
- McDonald, K.A., Kawaguchi, T., Qi, Q., Peng, X., Asaoka, M., Young, J., et al., 2019. Tumor heterogeneity correlates with less immune response and worse survival in breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 26, 2191–2199. <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07338-3>.
- Nagarajan, D., McArdle, S., 2018. Immune landscape of breast cancers. *Biomedicines* 6, 1–20. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010020>.
- NoeDomínguez-Romero, A., Zamora-Alvarado, R., Servín-Blanco, R., Perez-Hernandez, E.G., Castrillon-Rivera, L.E., Munguía, M.E., 2014. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 3201–3213. <https://doi.org/10.4161/hv.29679>.
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., et al., 2017. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 547, 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature22991>.
- Ott, P.A., Hu-Lieskovan, S., Chmielowski, B., Govindan, R., Naing, A., Bhardwaj, N., et al., 2020. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer. *Cell* 183, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.053> e24.
- Ouzounova, M., Lee, E., Piranlioglu, R., El Andaloussi, A., Kolhe, R., Demirci, M.F., et al., 2017. Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat. Commun.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms14979>.
- Pandey, A., Stawiski, E.W., Durinck, S., Gowda, H., Goldstein, L.D., Barbhuiya, M.A., et al., 2020. Integrated genomic analysis reveals mutated ELF3 as a potential gallbladder cancer vaccine candidate. *Nat. Commun.* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17880-4>.
- Pedroza-Roldan, C., Charles-Niño, C., Saavedra, R., Govezensky, T., Vaca, L., Avannis-Aghajani, E., et al., 2009. Variable epitope library- based vaccines: shooting moving

- targets. *Mol. Immunol.* 47, 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.024>.
- Piranlioglu, R., Lee, E., Ouzounova, M., Bollag, R.J., Vinyard, A.H., Arbab, A.S., et al., 2019. Primary tumor-induced immunity eradicates disseminated tumor cells in syngeneic mouse model. *Nat. Commun.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09015-1>.
- Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S., 2001. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>. Chapter 20, pp. 2.1–20.2.16.
- Ramos-Casals, M., Brahmer, J.R., Callahan, M.K., Flores-Chávez, A., Keegan, N., Khamashta, M.A., 2020. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Dis. Primers* 6, 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0160-6>.
- Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W.J., Sims, J.S., 2017. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell* 171, 934–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.028>.
- Rohrer, J.W., Barsoum, A.L., Coggin, J.H., 2006. Identification of oncofetal antigen/immature laminin receptor protein epitopes that activate BALB/c mouse OFA/iLRP-specific effector and regulatory T cell clones. *J. Immunol.* 176, 2844–2856. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2844>.
- Rosenthal, R., Cadieux, E.L., Salgado, R., Bakir, M.A., Moore, D.A., Hiley, C.T., 2019. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* 567, 479–485. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1032-7>.
- Sahin, U., Derhovanessian, E., Miller, M., Kloke, B.P., Simon, P., Löwer, M., 2017. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 547, 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature23003>.
- Sahin, U., Oehm, P., Derhovanessian, E., Jabulowsky, R.A., Vormehr, M., Gold, M., Maurus, D., 2020. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* 585, 107–112. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2537-9>.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., Bukur, T., Bukur, V., Holtsträter, C., 2020. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front. Oncol.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>.
- Schumacher, T.N., Scheper, W., Kvistborg, P., 2019. Cancer neoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 173–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053402>.
- Servín-Blanco, R., Zamora-Alvarado, R., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., 2016. Antigenic variability: obstacles on the road to vaccines against traditionally difficult targets. *Hum. Vaccines Immunother.* 12, 2640–2648. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1191718>.
- Servín-Blanco, R., Chávaro-Ortiz, R.M., Zamora-Alvarado, R., Martínez-Cortés, F., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., 2018. Generation of cancer vaccine immunogens derived from major histocompatibility complex (MHC) class I molecules using variable epitope libraries. *Immunol. Lett.* 204, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.008>.
- Shemesh, C.S., Hsu, J.C., Hosseini, I., Shen, B., Rotte, A., Twomey, P., 2021. Personalized cancer vaccines: clinical landscape, challenges, and opportunities. *Mol. Ther.* 29, 555–570. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.038>.
- Siegel, S., Wagner, A., Friedrichs, B., Wendeler, A., Wendel, L., Kabelitz, D., et al., 2006. Identification of HLA-A*0201-presented T cell epitopes derived from the oncofetal antigen-immature laminin receptor protein in patients with hematological malignancies. *J. Immunol.* 176, 6935–6944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6935>.
- Stern, P.L., Harrop, R., 2017. 5T4 oncofetal antigen: an attractive target for immune intervention in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 415–426. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1917-3>.
- Syed Khaja, A.S., Toor, S.M., El Salhat, H., Faour, I., Haq, N.U., Ali, B.R., Elkord, E., 2017. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget* 8, 33159–33171. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16565>.
- Tsoras, A.N., Champion, J.A., 2018. Cross-linked peptide nanoclusters for delivery of oncofetal antigen as a cancer vaccine. *Bioconjug. Chem.* 29, 776–785. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00079>.
- Valilou, S.F., Rezaei, N., 2019. Tumor antigens. In: Rezaei, N., Keshavarz-Fathi, M. (Eds.), *Vaccines for Cancer Immunotherapy*. Academic Press, pp. 61–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814039-0.00004-7>.
- Van den Eynden, J., Jiménez-Sánchez, A., Miller, M.L., Larsson, E., 2019. Lack of detectable neoantigen depletion signals in the untreated cancer genome. *Nat. Genet.* 51, 1741–1748. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0532-6>.
- Verdegaal, E.M., de Miranda, N.F., Visser, M., Harryvan, T., Van Buuren, M.M., Andersen, R.S., et al., 2016. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma–T-cell interactions. *Nature* 536, 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature18945>.
- Wang, H., Najibi, A.J., Sobral, M.C., Seo, B.R., Lee, J.Y., Wu, D., et al., 2020. Biomaterial-based scaffold for in situ chemo-immunotherapy to treat poorly immunogenic tumors. *Nat. Commun.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19540-z>.
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, D.L., Lim, M., Hirte, H., et al., 2017. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18, 1373–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X).
- Yang, W., Lee, K.W., Srivastava, R.M., Kuo, F., Krishna, C., Chowell, D., et al., 2019. Immunogenic neoantigens derived from gene fusions stimulate T cell responses. *Nat. Med.* 25, 767–775. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0434-2>.