

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
IDENTIFICACIÓN DE MIMÓTOPOS INVOLUCRADOS EN LA  
RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA MELANOMA A PARTIR  
DE UNA BIBLIOTECA COMBINATORIA DE EPÍTOPOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JESUS GUZMAN VALLE

ASESORES

Dr. Karen Manoutcharian

Dr. José Alberto Cano Buendía

Ciudad Universitaria, CDMX

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIA

El tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo es para mi familia que me ha apoyado a lo largo de los años.

A mi hijo Tonatiuh quien no comprende por qué pasó horas sentado trabajando y ha sido mi inspiración para ver el mundo de manera diferente.

A Jessy quien ha estado conmigo desde el inicio; no habría llegado hasta aquí sin tu ayuda.

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco mucho al Dr. Karen Manoutcharian por la oportunidad de estar en su laboratorio y compartir su entusiasmo que él tiene por la ciencia y la vida. Muchas gracias por el tiempo que dedico, sus enseñanzas y su humor. “Solamente un loco podrá encontrar la cura para el cáncer”- K. Manoutcharian

Al Dr. José Alberto Cano Buendía por su apoyo en ordenar y estructurar mi proyecto, un reto que me había costado mucho trabajo.

A la M. en B. María Elena Munguía Zamudio por su asistencia técnica y su enseñanza desde mis inicios en el laboratorio como alumno de servicio social.

A mis compañeros del laboratorio Fernando, Allan, Dneftm, Josué que me ayudaron durante los últimos 2 años en el laboratorio del Dr. Manoutcharian.

Al Dr. Rodolfo Servín por todo el aprendizaje y paciencia durante mi trabajo de tesis. Este trabajo no lo pude haber hecho sin tu apoyo.

Al proyecto IN205216 financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT).

A los miembros del jurado.

A la UNAM y la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ANTECEDENTES .....	10
JUSTIFICACIÓN .....	14
HIPÓTESIS .....	15
OBJETIVO .....	15
MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
RESULTADOS .....	21
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIÓN .....	31
PERSPECTIVAS .....	32
REFERENCIAS .....	33

## RESUMEN

GUZMAN VALLE JESUS. Identificación de mimótopos involucrados en la respuesta inmune celular contra melanoma a partir de una biblioteca combinatoria de epítomos. Asesores: Dr. Karen Manoutcharian y Dr. José Alberto Cano Buendía.

El melanoma es uno de los cánceres más agresivos y es la principal causa de muertes por tumores de piel en humanos. A lo largo de más de dos décadas las inmunoterapias utilizadas contra el melanoma han demostrado no solamente lo difícil que es curar esta enfermedad, sino simplemente controlarla, ya que la metástasis es la principal causa de muerte.

En términos generales, la inestabilidad genómica así como la alta tasa de mutaciones hacen del cáncer una enfermedad difícil de atacar: las vacunas que se han utilizado no van dirigidas hacia este problema fundamental. La razón principal para el uso de las bibliotecas de mimótopos de alaninas (BMAs) es la variabilidad antigénica y la pérdida de antígenos que presentan las células cancerosas, lo cual es un mecanismo de evasión del sistema inmune que utiliza el cáncer. En el presente trabajo, se utilizaron epítomos compuestos de 9 a.a. en cuya secuencia se encuentran 7 alaninas y 2 aminoácidos de anclaje, para generar dos bibliotecas de epítomos, AX3 y AX5 con 3 y 5 mutaciones, respectivamente. Estos mimótopos se asemejan en su función a epítomos mutados que se podrían generar en tumores, sin estar restringidos a un antígeno determinado, con el fin de evitar el escape inmune por pérdida de antígenos tumorales. Las BMAs se han utilizado como tratamiento terapéutico en un modelo murino de melanoma. Nuestros resultados determinaron que estos inmunógenos son capaces de reducir el tamaño tumoral con respecto a los controles y aumentar el porcentaje de sobrevivencia en diferentes experimentos. El uso de las BMAs ha demostrado su potencial como inmunoterapia en contra del melanoma.

## INTRODUCCIÓN

### Cáncer

El cáncer es un grupo diverso de enfermedades que surge y se desarrolla mediante la acumulación de mutaciones somáticas y se caracteriza por la división descontrolada y acelerada de células anormales que presentan capacidad invasiva al tejido adyacente (1-2).

### Melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que se desarrolla de los melanocitos, células encargadas de la síntesis de melanina. Alrededor del 1% de los cánceres de piel diagnosticados en humanos son de tipo melanoma invasivo, siendo esta patología la principal causa de muerte por cáncer de piel (3). En México la incidencia es baja, 1.2 por cada 100,000 habitantes (4) en comparación con otros países como E.U., 23 por cada 100,00 habitantes (5), y Australia, 50 por cada 100,00 habitantes (6). El porcentaje de sobrevivencia con melanoma de 5 años depende del diagnóstico temprano: 98.5% para melanoma localizado donde únicamente se encuentra el tumor primario, 62.9% en melanoma con metástasis a linfonodos regionales y 19.9% en melanoma metastásico donde las células se han diseminado a distancia (7).

### Evolución clonal del cáncer

Anteriormente, se pensaba que el desarrollo tumoral seguía un patrón lineal de acumulación de mutaciones, pero actualmente se ha demostrado que este proceso es complejo e involucra múltiples procesos simultáneos. Greaves y Maley (2012) describieron cómo el cáncer evoluciona mediante procesos repetitivos de expansión clonal, diversificación genética y selección clonal dentro de panoramas adaptativos de ecosistemas en los tejidos (8). Además, la variación genómica heredable y selección natural han sido reconocidas como paralelos entre el cáncer y la evolución, de modo tal que se ha considerado el desarrollo del cáncer como un proceso Darwiniano (9).

### Alteraciones genómicas y genéticas en tumores

La secuencia de ADN de una célula cancerosa generalmente adquiere aberraciones o mutaciones somáticas (10). Estas incluyen sustituciones, inserciones o deleciones de fragmentos pequeños o grandes de ADN, amplificación genómica y re-arreglos (11).

Existen algunas mutaciones que resultan ser ventajosas para el desarrollo de células cancerosas malignas que son llamadas mutaciones “driver” (12).

## Epidemiología del cáncer

El cáncer es una prioridad de salud pública a nivel mundial, se estima que causa una de cada seis muertes y es la segunda causa de muerte globalmente después de las enfermedades cardiovasculares. Se estima que el cáncer fue responsable de alrededor de 9.6 millones de muertes en el año 2018, un número que ha aumentado a través de los años (13). En México, es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y de la diabetes mellitus.

## Características adquiridas del cáncer

Los investigadores Hanahan y Weinberg desarrollaron el concepto de “Hallmarks del cáncer”, el cual es un grupo de características o fenotipos que por si mismos presentan ventajas selectivas para las células cancerosas, de tal manera que sirven individualmente como impulso en la evolución del cáncer. Este grupo de características reduce el conocimiento vasto y disperso a principios generales aplicables a casi cualquier tipo de cáncer (14-15). Entre estas se encuentran:

### 1. Autosuficiencia en señales de crecimiento

En las células tumorales, los mecanismos de señalización para el crecimiento y proliferación albergan una o más alteraciones que generan ventajas de sobrevivencia, liberándolas de la dependencia de señales exógenas. Se ha encontrado que muchos oncogenes son los encargados de modular esta habilidad, como es en el caso de los genes que codifican para las proteínas Ras, que forman una familia de oncogenes que al mutarse codifican para formas alteradas y permiten la liberación de señales mitogénicas (16). Existe también la estimulación autocrina mediante factores solubles de crecimiento, por ejemplo TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformante alfa), al igual que la sobre expresión de receptores como EGF-R (receptor para el factor de crecimiento epidermal) lo cual permite a las células cancerosas ser híper responsivas a concentraciones bajas de factores de crecimiento, que normalmente no incitarían la proliferación (17).

### 2. Insensibilidad a señales antiproliferativas

Esta habilidad es adquirida a través de mutaciones que inducen la pérdida de función sobre genes que codifican para proteínas supresoras de tumores como la p53 y retinoblastoma. La



proteína p53 actúa principalmente como un factor de transcripción regulando genes que pueden activar la apoptosis o detener la progresión del ciclo celular en caso de: daño al ADN, activación de oncogenes o hipoxia. La mayoría de los cánceres adquieren mutaciones que eliminan la función de este gen, permitiendo así el avance en el ciclo celular en cualquiera de sus puntos a pesar del daño en el ADN (18).

### 3. Evasión de la apoptosis

Para sobrevivir y proliferar las células cancerosas necesitan anular mecanismos de control que de otra manera inducirían la apoptosis. La resistencia a la apoptosis es adquirida, principalmente a través de la pérdida de la función de la proteína p53 mediante una mutación. En algunos casos, las células cancerosas pueden escapar de la apoptosis mediante el aumento o disminución de proteínas anti- o pro-apoptóticas, respectivamente, de la familia BCL-2. (19).

### 4. Potencial replicativo ilimitado

Durante el desarrollo tumoral las poblaciones de células premalignas llegan al límite de su potencial mitótico y la adquisición del potencial replicativo ilimitado permite el progreso tumoral. Los telómeros ubicados en los extremos de los cromosomas actúan como un mecanismo de conteo para generaciones de células, acortándose en cada división celular resultando en fusiones cromosómicas y la inevitable muerte de la célula (20). En casi todas las células cancerosas, los telómeros se mantienen mediante el aumento en la expresión de la enzima telomerasa, permitiendo la proliferación de las células tumorales (21).

### 5. Angiogénesis sostenida

La formación de nuevos vasos sanguíneos es un prerrequisito para la formación de tumores macroscópicos. Se conocen más de dos docenas de factores que inducen la angiogénesis, al igual que una cantidad semejante de factores inhibitorios. El más conocido de estos factores es el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), el cual puede inducir y mantener la angiogénesis cuando este factor se sobreexpresa (22-23).

### 6. Invasión de tejidos y metástasis

La migración de células tumorales es un proceso adaptativo que depende de la interacción celular coordinada con el ambiente, influyendo a la vez: la adhesión entre matriz-célula y célula-célula, dinámicas del citoesqueleto, y la remodelación de la matriz extracelular (24). Diferentes proteínas involucradas en la interacción intercelular se ven alteradas,

principalmente las CAMs (moléculas de adhesión celular) e integrinas. La sobreexpresión de genes para proteasas extracelulares y la subexpresión de genes inhibidores de proteasas extracelulares coadyuvan durante estos procesos (25).

## 7. Características que permiten el desarrollo de las habilidades generales del cáncer

La adquisición de las características generales antes descritas es posible debido a la inflamación intra-tumoral y la inestabilidad genómica y mutaciones. Las mutaciones que inhabilitan el funcionamiento correcto de genes como *p53* y/o las diversas proteínas involucradas en la reparación de desapareamiento de bases, las cuales son fundamentales para mantener y reparar el genoma, pueden acelerar la acumulación de mutaciones (26). La acumulación de mutaciones puede generar genotipos que pueden conferir ventajas a clonas de células tumorales, permitiendo la expansión de estas y por ende la progresión del tumor. Se conoce que la respuesta inflamatoria asociada a tumores promueve y aumenta la progresión de estos. Este proceso es llevado a cabo por células del sistema inmune innato (macrófagos, células NK asesinas naturales) y adaptativo (linfocitos T reguladores, linfocitos T cooperadores). En el microambiente tumoral los leucocitos activados crónicamente proveen factores de crecimiento mitogénicos (TGF  $\beta$ , VEGF) los cuales estimulan la proliferación de las células cancerosas y el estroma asociado al tumor (27).

### Respuesta Inmune al Cáncer

El concepto de inmunovigilancia postula que el sistema inmune puede eliminar células transformadas en sus estados iniciales, las cuales se generan continuamente en el cuerpo. Esta hipótesis se basa en la idea de que las células cancerosas normalmente son reconocidas como no propias y son capaces de inducir una reacción de rechazo. Este concepto ha sido integrado en la teoría de la inmunoección en cáncer (28-29).

### Inmunoección en cáncer

La idea de que el sistema inmune no solamente protege al hospedero sino también modifica la inmunogenicidad tumoral, forma la base de la hipótesis de la inmunoección en el cáncer (30). Desde 1991 se conoce que los complejos péptido-MHC (complejo principal de histocompatibilidad) específicos de células cancerosas pueden ser reconocidos por linfocitos T CD4+ y CD8+ (31-32). En la inmunoección, estas células son reconocidas por los linfocitos T y consecuentemente son eliminadas, en el mejor de los casos; sin embargo,

el tumor se puede modificar por esta interacción, produciendo variantes que utilizan mecanismos para escapar la detección inmune y/o que son menos inmunogénicas y no inducen una respuesta inmune. Se ha postulado que la inmunoección en cáncer se lleva a cabo de manera secuencial a través de tres fases distintas que son: eliminación, equilibrio y escape (33-34).

### 1. Eliminación

En esta fase se lleva a cabo una respuesta favorable por parte del sistema inmune, donde el tumor es detectado y eliminado por completo. Se han propuesto cuatro fases para el proceso de eliminación: a) Reconocimiento de células tumorales por células del sistema inmune innato y la lisis (limitada) de estas. b) La maduración y migración de células dendríticas más la activación de linfocitos T vírgenes. c) La activación de linfocitos T específicos para antígenos tumorales. d) La migración de esos linfocitos T al sitio tumoral y eliminación de las células tumorales (35).

### 2. Equilibrio

Se ha postulado que es la fase de mayor duración, donde los tumores parecen estar inactivos por años debido a los procesos dinámicos dentro de estos. La inestabilidad genética y división celular constante genera nuevas variantes dentro del tumor con inmunogenicidad reducida, es decir, mutaciones que no estimulan una respuesta, lo cual confiere mayor resistencia a la detección inmune. Durante esta fase hay un equilibrio dinámico entre la producción de nuevas variantes con baja inmunogenicidad y la eliminación de variantes inmunogénicas. Al mismo tiempo, las células cancerosas siguen acumulando mutaciones al azar o como respuesta a las células del sistema inmune (36).

### 3. Escape

Las células tumorales que han adquirido la habilidad de evadir el reconocimiento por el sistema inmune y/o su eliminación, surgen como tumores detectables clínicamente (37). Una razón por la cual las inmunoterapias contra el cáncer no pueden no funcionar es debido a la pérdida o disminución de la producción de la molécula de clase I del MHC (MHC-I) expresada sobre las células cancerosas, la cual es necesaria para la detección y eliminación por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (38). En el microambiente tumoral, las células del sistema inmune o las células cancerosas producen citocinas que ejercen un efecto inmunosupresor, tales como: VEGF, IL-10 (interleucina-10), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante) o

moléculas inmunoregulatoras como IDO (indoleamina 2,3 dioxigenasa) o PD-1/PD-L1 (receptor/ ligando de muerte celular programada) (39).

## Terapia contra el Melanoma

El melanoma es de los cánceres más agresivos y resistentes a la terapia y su alta heterogeneidad genómica lo hacen un blanco difícil de atacar. Durante el desarrollo temprano del melanoma, cuando no hay metástasis a distancia, las terapias tradicionales que consisten en; quimioterapia, radioterapia y cirugía son usadas como primera línea de tratamiento, al igual que diversas inmunoterapias, las cuales presentan una eficacia variable. Generalmente, no se utilizan monoterapias (uso de un solo tratamiento) en el tratamiento del melanoma se prefiere la terapia combinada. Actualmente, lo más utilizado para el tratamiento del melanoma metastásico son las inmunoterapias (40-42), las cuales se describen a continuación.

### Inmunoterapia en melanoma metastásico

La inmunoterapia en cáncer tiene como finalidad estimular los componentes del sistema inmune con el fin de potencializar la respuesta inmune contra esta enfermedad (43). El principal objetivo de las inmunoterapias en cáncer es la inducción de linfocitos T citotóxicos. De manera general, estos son activados al reconocer péptidos de 8 a 11 aminoácidos derivados de la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos. Los péptidos, provenientes de antígenos propios o patógenos a la vez son presentados en el contexto de la molécula MHC de clase I (44). Las siguientes categorías engloban las inmunoterapias más relevantes en melanoma metastásico.

#### 1. Inhibidores de puntos de control inmunitarios

Las moléculas PD-1 y CTLA-4 tienen función de inmunomodulación negativa, es decir, inhiben la actividad funcional y la activación de los linfocitos T, respectivamente.

CTLA-4 es una molécula co-estimuladora con efectos negativos sobre la activación de linfocitos T. Esta molécula se encuentra intracelular en linfocitos T en reposo y es mediante la activación de estas que se induce su expresión y el transporte a la superficie celular (45). La función inhibitoria ocurre durante la interacción con su ligando B7, expresado sobre células presentadoras de antígenos, resultando en la inhibición de la producción de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4), la expresión del receptor para la IL-2 y la progresión en el ciclo celular (46). Además, suprime de manera indirecta la activación del linfocito T

mediante la activación de células T reguladoras las cuales son esenciales para la tolerancia periférica.

A diferencia de la molécula CTLA-4 la cual se expresa por linfocitos T, la molécula PD-1 es expresada por linfocitos T y B activados, al igual que células mieloides (dendríticas, macrófagos, polimorfonucleares, mastocitos, entre otras). El principal ligando para esta molécula, PD-L1 es expresado por leucocitos, las células de melanoma y puede ser inducido en tejidos no linfoides mediante citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ ) (47-49).

La inhibición de estos puntos de control negativos se logra a través del uso de anticuerpos monoclonales que bloquean estas moléculas y así los linfocitos T recuperan el funcionamiento que ha sido restringido a causa de las mismas (50). No obstante, al incrementar la actividad del sistema inmune, el bloqueo de los puntos de control puede tener efectos inflamatorios sistémicos, lo cual resulta en toxicidad en la mayoría de los pacientes (51). A pesar de su uso como primera línea de terapia en contra del melanoma, la mayoría de los pacientes no tienen respuestas duraderas lo cual resulta en reincidencia o recaída y su uso está restringido a tumores y pacientes específicos (52).

## 2. Estimulación de linfocitos T citotóxicos

Una de las primeras inmunoterapias implementadas se refiere al uso de IL-2 en dosis altas. Las respuestas obtenidas eran similares al uso de quimioterapias, es decir del 10 al 20% de los pacientes respondían a esta intervención. Desafortunadamente, debido a sus efectos adversos que también pueden incluir daño a múltiples órganos y respuestas inflamatorias parecidas a sepsis, su uso es limitado y ha sido reemplazado por los anticuerpos monoclonales contra los puntos de control inmunitarios.

## 3. Vacunas contra melanoma

En esta modalidad se encuentran las vacunas diseñadas a partir de antígenos tumorales. Los antígenos más utilizados en el diseño de vacunas contra melanoma son la glicoproteína gp100 y el antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE-A3) (53). Las vacunas generadas a partir de estos antígenos han tenido un éxito limitado, principalmente, debido a que el diseño de las vacunas se ha enfocado en utilizar antígenos comunes asociados a tumores, que en realidad son antígenos propios y es evidente que estos no son los inmunógenos más adecuados (54-55).

#### 4. Vacunas basadas en neo-antígenos

Las vacunas convencionales contra cáncer dirigidas hacia antígenos comunes han tenido eficacia clínica limitada, en años recientes se ha preferido el uso de los neo-antígenos, los cuales son antígenos generados a partir de mutaciones específicas de tumor durante la transformación neoplásica. Debido a su origen, no están sujetos a la tolerancia central durante la selección negativa en el timo, lo cual permite que puedan llegar a ser reconocidos como no propios por el sistema inmune (56). En estudios clínicos, el tiempo promedio desde la adquisición de la muestra hasta la administración de la vacuna es de 4.5 meses (57). Estos antígenos tienen la limitante de ser de uso único, ya que ofrecen un panorama genético de un tiempo y localización específico, el cual se sabe que es cambiante y heterogéneo (58).

## ANTECEDENTES

### Patógenos antigénicamente variables

Actualmente, uno de los principales obstáculos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas es la variabilidad antigénica de los patógenos (54). La variabilidad genética y antigénica, también es una característica común del cáncer y de muchos patógenos importantes en el ser humano, como: VIH (virus de inmunodeficiencia humana), HCV (virus de hepatitis C), DENV (virus de dengue), influenza, Ébola y malaria. No obstante, los blancos terapéuticos (inmunógenos) de las vacunas actuales contra el cáncer están basados en regiones conservadas, es decir, proteínas poco variables. Estos antígenos, que posiblemente, ya han sido seleccionadas de manera natural por el sistema inmune como regiones antigénicas que no tienen epítomos protectores, difícilmente funcionarán como inmunógenos en vacunas terapéuticas (55-56). Los antígenos tumorales comunes, es decir, aquellos identificados frecuentemente en ciertos tipos tumorales, son usados menos en la actualidad debido a que no ofrecen protección en contra de la progresión del cáncer.

### Pecado antigénico original

La variabilidad antigénica de patógenos puede generar el fenómeno conocido como pecado antigénico original: fue descrito por primera vez a mediados del siglo pasado por el investigador Thomas Francis Jr. y colegas. Ellos hicieron la observaron que la respuesta humoral a cepas de influenza generadas a edad temprana en una persona dominan la respuesta en contra de la influenza en futuras ocasiones (62). Específicamente, esta teoría postula que cuando un individuo es expuesto de manera secuencial a variantes de un antígeno al cual un individuo ya había sido expuesto previamente, la respuesta inmune inducida por el antígeno variante será dirigida hacia el primer antígeno reconocido por el sistema inmune (63-64) Este efecto se ha visto en la respuesta inmune hacia: patógenos relacionados, diferentes miembros de un grupo viral y enfermedades inducidas por agentes que contienen altas tasas mutacionales (65-68).

El caso más recientemente documentado, ha sido con una vacuna contra el dengue, la cual resulta más peligrosa que la propia enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) detuvo su uso al concluir, en conjunto con Sanofi Pasteur quien la producía, que su

administración en gente sin historial de infección previa podría dejarlos más vulnerables a una reacción severa si eran infectados subsecuentemente (62).

### Despliegue en Fago

El despliegue en fago es una técnica en la que se expresan péptidos o proteínas fusionadas a la cápside de fagos. Esta tecnología se basa en el hecho de que el fenotipo y genotipo del fago se mantienen, es decir, el gen que codifica la molécula desplegada se encuentra dentro del virión como parte de su ADN. Por lo tanto, para llevar a cabo el despliegue en fago se fusiona el gen de interés, con el gen de la proteína donde se quiere la expresión, en el genoma del fago (70).

El fago más utilizado en esta técnica es el fago filamentosos M13 que infecta a células de *E. coli* a través del pili F. El genoma del fago M13 tiene una longitud de 6407 pares de bases y codifica 11 proteínas que se requieren para la formación de nuevas partículas virales. Estas proteínas están agrupadas por función: aquellas involucradas en la síntesis de ADN (pII, pV y pX), proteínas que participan en el ensamblaje de las partículas virales (pI, pIV y pXI) y las proteínas estructurales que conforman la cápside (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) (71).

Los modelos más comunes de despliegue en fago consisten en la clonación de los fragmentos de ADN que codifican el epítipo de interés en los genes que codifican a las proteínas pIII o pVIII. Sin embargo, al utilizar epítipos de más de 10 residuos, empleando la proteína pVIII, se compromete la función de la cápside y no son desplegados eficientemente, por ende se utilizan fagémidos en el modelo híbrido de despliegue en fago. Un resumen del ciclo de vida que se lleva a cabo durante el despliegue en fago se puede ver adelante (Figura 1).



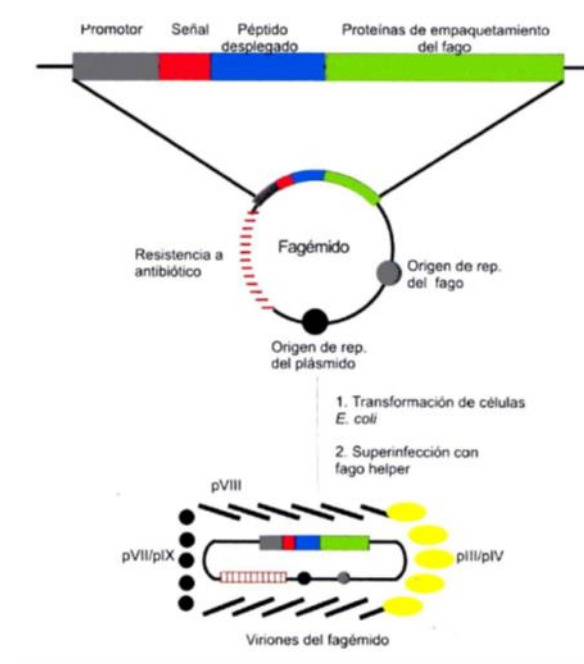


Figura 1. Despliegue en fago híbrido con vector fagémido. Un fagémido es un plásmido híbrido y contiene: orígenes de replicación para ADN de doble cadena y cadena sencilla (i.e., orígenes para el plásmido y fago), un gen de resistencia a antibiótico, el gen III u VIII para la fusión con el epítipo de interés el cual está bajo el control de un promotor, un sitio múltiple de clonación y una señal de empaquetamiento de fago. Los fagémidos son convertidos en fagos infectivos mediante una superinfección de las células transformadas con fagémidos con un fago ayudador (72).

En el sistema de expresión híbrido 8+8, los fagos recombinantes presentan cápsidas con proteínas pVIII nativas y pVIII recombinantes (73-74). Se requiere de dos genes que codifican para la proteína pVIII en genomas separados, la versión recombinante se encuentra en el fagémido y la nativa en un fago ayudador.

Los fagémidos no contienen los genes que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales requeridas para producir un fago completo, por lo que se requiere de un fago ayudador que proporcione los componentes necesarios para el ensamble del fago.

Después de transformar bacterias con un fagémido, este puede convertirse en fago infectivo y empaquetarse en un fago M13 recombinante, mediante una superinfección con un fago ayudador, a este proceso se le denomina rescate de fago. El genoma del fago ayudador tiene un origen de replicación defectuoso, por lo que se favorece el empaquetamiento de la cadena sencilla del fagémido (75).

## Vacunas de péptidos alternativos

La idea de modificar epítomos para mejorar su afinidad hacia la molécula MHC-I y/o inducir respuestas celulares específicas en contra del tumor, ha sido empleada en contra del melanoma por más de 20 años (76). Para el desarrollo de vacunas peptídicas en contra de diversos tipos de cáncer, se han generado alternativas de péptidos llamadas ligandos peptídicos alterados o mimótopos (versiones mutadas de epítomos naturales) entre otros, como opciones para inducir respuestas inmunes anti tumorales (77-79) o inclusive en contra de otras enfermedades (80-81). Estas formas alternativas se han usado debido a los pobres resultados obtenidos al usar los antígenos tumorales en su estado nominal, es decir epítomos sin modificaciones en su secuencia. Sin embargo, un péptido modificado sigue siendo una secuencia fija a pesar de ser una variante inmunogénica y se conoce que las células cancerosas pueden generar mutaciones en respuesta a las intervenciones terapéuticas con el fin de escapar la detección por las células del sistema inmune. Una herramienta potente que se ha utilizado últimamente es el escaneo posicional de bibliotecas combinatorias de péptidos sintéticos, para identificar ligandos para linfocitos T citotóxicos específicos de tumor (82). El principal objetivo de las bibliotecas combinatorias es identificar péptidos y utilizarlos directamente como inmunógenos. Sin embargo, en algunos estudios el único efecto obtenido al utilizar estos péptidos ha sido retrasar el crecimiento tumoral (83).

## JUSTIFICACIÓN

### Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs)

El problema de la variabilidad antigénica en cáncer no se ha estudiado adecuadamente en el diseño de nuevos conceptos de vacunas. La producción de nuevos fármacos contra el cáncer, ha revelado al mismo tiempo nuevos mecanismos de resistencia a estos (84). En este trabajo se utilizó una nueva estrategia, desarrollada por el Dr. Manoutcharian, para la construcción de inmunógenos basada en conceptos simples pero fundamentales. Una vacuna debe mimetizar las condiciones de la enfermedad a nivel de epítomo y ser capaz de inducir respuestas inmunes que se asemejen a las respuestas inducidas por patógenos. Las BEVs consisten de un repertorio amplio de mutaciones inducidas en la secuencia de aminoácidos de un epítomo, simulando las variaciones que ocurren en estos durante el desarrollo de la enfermedad (85). Estos se despliegan en bacteriófagos (fagos) M13 como péptidos fusionados a la proteína pVIII mediante la técnica de despliegue en fagos. La estabilidad de los fagos bajo diferentes condiciones (pH y temperatura), efectos inmunogénicos y capacidad como adyuvante potente les ha permitido ser usados como un formato para generar inmunógenos (86-88). Este nuevo concepto fue utilizado en el desarrollo de inmunógenos en contra del cáncer por Noe Domínguez (2014) y Pedroza-Roldan (2009) en contra del VIH (virus de inmunodeficiencia humana).

### Escaneo combinatorio de alanina

Las bibliotecas combinatorias de proteínas con sustituciones de alanina son usadas para identificar residuos importantes para la función, estabilidad o estructura de una proteína de interés. Las sustituciones por cada aminoácido que no sea alanina en la secuencia peptídica permite examinar la contribución relativa de cada aminoácido dentro de esta (89-90). Se sabe que se puede sustituir cualquier aminoácido con alanina sin introducir problemas de estabilidad estructural, ya que este tiene un grupo metilo en su cadena lateral, el cual elimina contacto con otros residuos: La sustitución con alanina puede eliminar los cambios conformacionales inducidos por la unión entre proteínas ya que esta es considerada químicamente inerte (91). Se sabe que existen cambios conformacionales cuando se forma el complejo TCR-péptido/MHC debido a la composición del péptido anclado y los péptidos menos estables son reconocidos débilmente debido a la menor fuerza de unión (92).

## HIPÓTESIS

La identificación de mimótopos para linfocitos T involucrados en la respuesta celular contra tumores permitirá generar inmunógenos capaces de romper la tolerancia inmunológica y activar un repertorio más amplio de células T con propiedades antitumorales.

## OBJETIVO

Evaluar el efecto antitumoral de las bibliotecas de mimótopos de alaninas (BMAs) en un modelo murino de melanoma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Descripción de las Bibliotecas de Mimótopos de Alaninas (BMAs)

Se utilizaron células *E. coli* TG1 transformadas previamente con el fagémido pG8SAET-inserto correspondientes a cada biblioteca o a la secuencia nominal, conforme al sistema de expresión fagémido M13, para expresar las proteínas recombinantes en la pVIII de la capsida. La secuencia nominal y las dos BMAs, llamadas AX3 y AX5, están conformadas por epítomos de 9 aminoácidos. Se mantuvieron las posiciones de anclaje a la molécula MHC-I para el haplotipo H2-D<sup>b</sup> de la cepa de ratones C57BL/6. La diferencia entre las bibliotecas AX3 y AX5 es el número de posiciones mutadas con 3 y 5, respectivamente (Tabla 1); la secuencia nominal no presenta ninguna modificación, está conformada por 7 residuos de alaninas mas las 2 posiciones de anclaje. Se hizo una revisión en la base de datos de IEDB (Immune Epitope Database and Analysis Resource) y no se encontró ningún antígeno que estuviera relacionado con la secuencia NPBA o con homología, para ratones del mismo haplotipo.

Tabla 1: Composición de la secuencia nominal y las dos bibliotecas AX3 y AX5

Descripción de secuencia	Nombre	Composición de amino ácidos
Biblioteca con 3 mutaciones al azar	AX3	A <b>X</b> A <b>X</b> N <b>X</b> AAL
Biblioteca con 5 mutaciones al azar	AX5	A <b>X</b> <b>X</b> <b>X</b> N <b>X</b> <b>X</b> AL
Secuencia nominal sin mutaciones	NPBA	AAAANAAAL

Las **X** en la secuencia señalan las posiciones mutadas que representan cualquiera de los 20 aminoácidos. La secuencia NPBA es la base para la generación de las dos bibliotecas.

### Rescate de bibliotecas con fago ayudador y obtención de fagos recombinantes

El rescate de las bibliotecas se efectuó a partir de células *E. coli* TG1 previamente transformadas con el fagémido pG8SAET clonado con los insertos que contienen las variantes para cada biblioteca. Se hizo un cultivo en medio 2xYT de las cepas de *E. coli* TG1 transformadas, suplementado con carbenicilina (50 µg/ml) y se incubó durante 18 horas a 37°C en agitación a 250 rpm. Posteriormente, se realizó un subcultivo mediante una

dilución 1:100 utilizando medio 2XYT suplementado con carbenicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubó bajo las mismas condiciones. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.7 se agregó el fago ayudador M13K07 a una MOI de 10 y se realizaron dos periodos de incubación de 30 minutos. Durante el primer periodo, se incubó a 37°C sin agitación y en el segundo se incubó a 37 °C en agitación (250 rpm). Transcurrida esta incubación se agregó medio fresco de YT2X con kanamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y carbenicilina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubó por 20 horas a 30°C y 250 rpm. El cultivo se centrifugó a 8,000 rpm por 20 min a 4 °C y. El sobrenadante se recuperó y se agregó una solución de polietilenglicol (PEG) 8000 al 20% cloruro de sodio (NaCl) 2.5 M, equivalente a 1/6 del volumen total del sobrenadante recuperado. Se mezcló y dejó a 4°C por 24 h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. El paquete de fagos se resuspendió con TBS (50 mM Tris-HCl, 150nM NaCl, pH= 7.4) frío y se mezcló un volumen equivalente a 1/5 del volumen de la suspensión anterior con la solución de PEG/NaCl. Se incubó por 24 h a 4°C y después de este periodo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete con 3 ml de TBS frío y se almacenó a 4°C. El título de las bibliotecas así como el del fago conteniendo la secuencia nominal, se determinó mediante diluciones seriadas tomando 1  $\mu\text{l}$  de la dilución 3 e infectando células *E. coli* TG1. En la Figura 2, se muestra cómo se realizaron las diluciones para titular los fagos recombinantes. Posteriormente, se plaquearon en medio de agar LB (Luria-Bertani) con carbenicilina y se dejaron en incubación a 37° C por 18 horas. Después de la incubación se hizo el conteo de colonias para determinar la concentración de fagos infectivos usando el factor de dilución para determinar la concentración de fagos infectivos por ml.

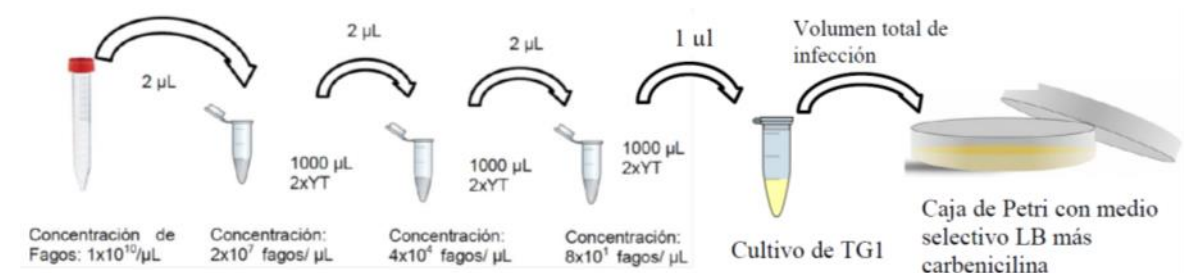


Figura 2. Diluciones para la titulación de fagos. El primer tubo contiene los fagos suspendidos en TBS. Se toma 1  $\mu\text{l}$  de la última dilución para infectar células de *E. coli* TG1. La infección se plaquea en medio selectivo y se incuba por 18 h.

## Inmunizaciones para determinar la inmunogenicidad de las BMAs

Se realizó un experimento preliminar con las bibliotecas para poder determinar la inmunogenicidad de estas ya que es la primera vez que se evalúan las bibliotecas de mimótopos de alaninas construidas para el haplotipo H2-D<sup>b</sup> de ratones C57BL/6.

Se utilizaron 2 ratones machos de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad por cada grupo experimental los cuales fueron: NPBA, AX3, AX5 y un grupo de ratones control que no fueron inmunizados. Los ratones se inmunizaron a los días 0 y 15 del experimento por vía intravenosa, como hemos reportado previamente (85), con una concentración de fagos de  $2 \times 10^{12}$  UFC/200  $\mu$ L PBS. Los ratones se eutanasiaron al día 30 en cámara de CO<sub>2</sub>.

## Obtención de esplenocitos

Después de la eutanasia, se extrajeron los bazos y se perfundieron con 5 ml de medio DMEM no suplementado, utilizando una jeringa y aguja de calibre 28. El contenido se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis de eritrocitos (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> y 96.7  $\mu$ M EDTA·2Na) lo cual se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1,500 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió y se agregó 1 ml de medio DMEM (no suplementado). Se realizó el conteo de células con hemocitómetro y azul tripán para determinar la viabilidad de estas. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de bazo y se realizó una dilución (1:100) para cuantificar el número de células por ml.

## Ensayo de proliferación celular y análisis de datos

El análisis de proliferación celular se llevó a cabo utilizando el protocolo establecido (85, 93). En este, se tiñeron esplenocitos con 5,6 ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) (Tonbo Biosciences 13-0850, San Diego, EUA). Se tomó el volumen necesario de células por grupo experimental, se tiñeron con CFSE (2.5  $\mu$ M) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con una solución fría de PBS 1X/ 5% SFB y se centrifugaron por 5 min a 1,500 rpm. Las células se suspendieron en medio de proliferación (medio RPMI 1640

suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, β-mercaptoetanol 1%, piruvato de sodio 1% y aminoácidos no esenciales 1%) a una concentración celular final de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se transfirieron a una placa de 96 pozos ( $2 \times 10^5$  células/ pozo) y a estas se les agregaron los antígenos para estimular las células: las BMAs, la secuencia nominal o los antígenos no relacionados. Estos últimos consisten en: B22 la cual es una variante de una biblioteca para VIH. MUC, la cual es una biblioteca de mucina (MUC1, un antígeno asociado a tumores que se sobreexpresa en adenocarcinomas mamarios) no relacionada. G3D, una BMA diseñada para un haplotipo distinto (H-2D<sup>d</sup>).

Esta última, forma parte de bibliotecas generadas para ratones BALB/c, que consisten en la secuencia nominal NGD, la biblioteca G5D que contiene 5 posiciones mutadas y la ya mencionada, G3D, que contiene tres posiciones mutadas. Estas BMAs, están compuestas de epítomos de 9 aminoácidos, se mantienen las dos posiciones de anclaje (2, 3 y 9) y las posiciones restantes están compuestas de alaninas.

Las placas se incubaron por 72 horas en atmosfera húmedo (95% humedad relativa) con 5% CO<sub>2</sub> a 37° C. Después del periodo de incubación se agregó el anticuerpo anti CD3 (eBioscience, 47-0031-82, San Diego EUA) y se incubó por 1 hora. Se centrifugaron las placas a 400g por 10 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron y se colectaron las células con paraformaldehído 1% en tubos de policarbonato de 2 ml.

Las células se analizaron por citometría de flujo, empleando el citómetro Attune azul-rojo (Applied Biosystems, San Diego EUA) y adquiriendo el volumen total de las muestras (500 ml). Los resultados obtenidos se analizaron con el software FlowJo 7.6. Para determinar los porcentajes de proliferación celular de los esplenocitos CD3<sup>+</sup> se realizó un gráfico de tamaño versus granularidad en el cual se delimitó la región de linfocitos. A partir de esta región se obtuvieron los linfocitos CD3<sup>+</sup> y de esta se generó un histograma de la fluorescencia de CFSE vs el número de eventos para cada muestra. Con esta última se determinaron los porcentajes de proliferación celular CD3<sup>+</sup>.

### Mantenimiento y cultivo celular

Para la formación del tumor de melanoma se utilizó la línea celular B16F10. Las células fueron cultivadas en matraces de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de cuello angular tratado para cultivo de tejidos. Se utilizó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle



Medium) suplementado con: 10% suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.017 M bicarbonato de sodio. Los cultivos celulares se incubaron en atmósfera húmeda (95% humedad relativa) con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células se cosecharon cuando el cultivo llegó al 80% de su confluencia: se adicionó verseno (EDTA disódico a 0.02 %) para despegar las células y se incubó por 5 minutos a 37°C. Las células se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en PBS. Se realizó el conteo celular en hemocitómetro y la viabilidad se determinó mediante tinción con azul tripán.

**Implantación de las células B16F10 en ratones C57BL/6 y evaluación de la respuesta terapéutica de ratones portadores de tumor inmunizados con BMAs**

Se realizó un estudio de tratamiento terapéutico para evaluar el efecto antitumoral de las bibliotecas y la secuencia nominal. Se utilizaron 7 grupos de ratones machos de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, 5 ratones por cada grupo. Los grupos experimentales fueron los siguientes: AX3, AX5, NPBA y 4 inmunógenos no relacionados (B22, NGD, G3D y G5D). B22 sirve de control negativo y los otros tres son BMAs diseñadas para otro haplotipo (H-2D<sup>d</sup>) pero que sirven de control positivo para comprobar la promiscuidad de los linfocitos T en el reconocimiento de antígenos (94-96)

Se implantaron  $1 \times 10^5$  células B16F10/100µl en PBS por vía subcutánea en el flanco izquierdo en los ratones previamente descritos. Se determinó como implantación exitosa el aumento de volumen en el sitio de administración (97).

Se inmunizaron los ratones con una dosis única de  $2 \times 10^{12}$  UFC fagos/ 200µl PBS por vía intravenosa en la vena caudal lateral, 5 días después de la implantación de las células tumorales.

Para determinar la respuesta terapéutica de los ratones portadores de tumores B16F10 se realizaron mediciones de los tumores, largo por ancho del tumor, para calcular el área tumoral utilizando un vernier digital, como hemos reportado antes (85, 93). Se iniciaron las mediciones una vez que el tumor era palpable o visible y se efectuaron cada día hasta el día 30 cuando los ratones fueron sacrificados.

## RESULTADOS

### Títulos de las BMAs y de la secuencia nominal

Después de tres ocasiones de rescate de fago, se calculó el título promedio de las BMAs y la secuencia nominal NPBA. Este cálculo se presenta como el promedio de partículas virales infectivas. Los resultados son los siguientes: para la biblioteca AX3 fue  $7 \times 10^9$  UFC/ $\mu$ l, para la biblioteca AX5 fue  $4 \times 10^9$  UFC/ $\mu$ l y para la secuencia NPBA fue  $7 \times 10^9$  UFC/ $\mu$ l.

### Inmunizaciones para determinar la inmunogenicidad de las BMAs

En la Figura 3, se observan los porcentajes de proliferación de esplenocitos CD3+ de los grupos inmunizados con los fagos. Se observa que cuando esplenocitos CD3+ provenientes de los 4 grupos experimentales son estimulados con las bibliotecas AX3 y AX5 se obtuvieron porcentajes de proliferación entre el 6 y 10%. La estimulación con el antígeno NPBA indujo el menor porcentaje de proliferación (4-6%) lo cual es comparable con el control negativo MUC (4-7%). El grupo AX3 presentó los porcentajes de proliferación más altos ante estímulos con todos los antígenos, sin embargo, se puede observar que el porcentaje de proliferación más alto en este ensayo no fue por este grupo: el porcentaje de proliferación más alto (11.6%) fue por el grupo AX5 estimulado por el antígeno G3D. Este último antígeno se utilizó como control positivo en este experimento y forma parte de una BMA no relacionada. Los resultados de este experimento determinaron que la biblioteca AX3 indujo el mayor porcentaje de proliferación en la población CD3+ ante estímulos con diferentes antígenos. Con esta información de inmunogenicidad de las bibliotecas se procedió a utilizar estas en condiciones de tratamiento terapéutico.

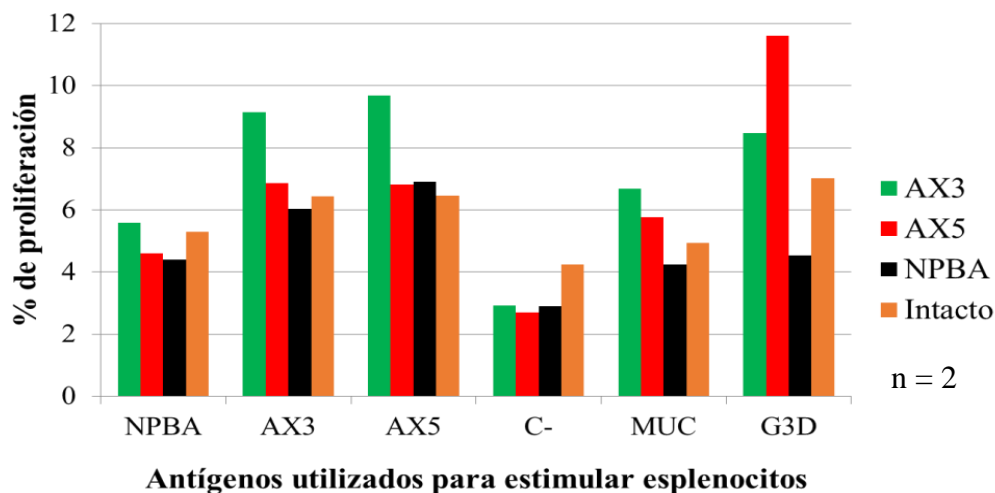


Figura 3. Ensayo de proliferación celular. Se usaron 4 grupos (AX3, AX5, NPBA y un grupo intacto) de 2 ratones. Se realizó un esquema prime-boost de inmunización a los 0 y 15 días, respectivamente, con las mismas dosis ( $2 \times 10^{12}$  UFC). MUC = biblioteca no relacionada de mucina. C- = control negativo. G3D= control positivo de una BMAs no relacionada diseñada para otro haplotipo.

#### Evaluación del efecto antitumoral de las BMAs y la secuencia nominal

Como se observa en la Figura 4, al día 28 el crecimiento tumoral promedio para los controles B22 y el control de implante están por arriba de las bibliotecas, con  $273 \text{ mm}^2$  y  $185 \text{ mm}^2$ , respectivamente. El grupo que presentó el mayor tamaño tumoral ( $446 \text{ mm}^2$ ) fue el que se inmunizó con NPBA y se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control de implante ( $185 \text{ mm}^2$ ) y AX3 ( $56 \text{ mm}^2$ ). Los grupos que presentaron el menor crecimiento tumoral al final del experimento fueron aquellos inmunizados con las bibliotecas AX3 ( $56 \text{ mm}^2$ ) y AX5 ( $110 \text{ mm}^2$ ) siendo estadísticamente significativo en el caso de AX3. De manera similar, aunque no sea estadísticamente significativo, se puede ver como los tumores en el grupo AX3 son 3 veces más pequeños en comparación con el control de implante.

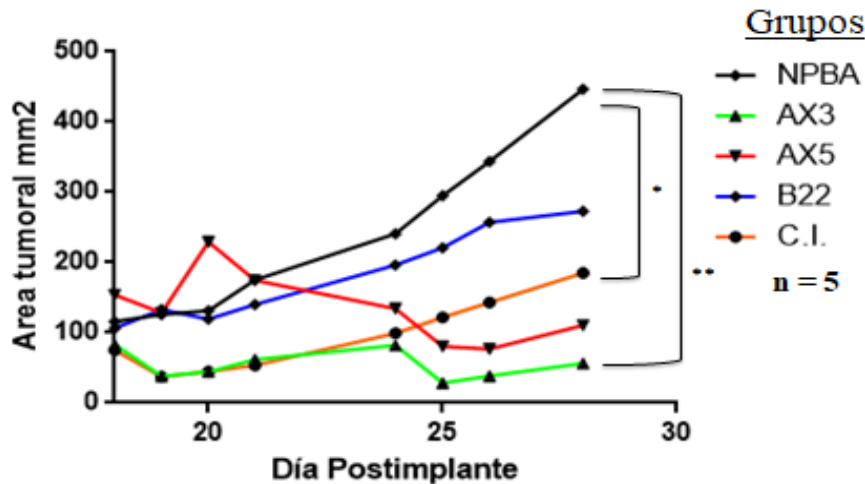


Figura 4. Respuesta terapéutica de ratones portadores de tumor B16F10. Se implantaron células B16F10 ( $1 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l PBS) al día 0 y se administró una dosis única ( $2 \times 10^{12}$  UFC fagos/200  $\mu$ l PBS por vía IV) al día 5. C.I.= control de implante. B22= variante no relacionada usado como control negativo. Los valores de P se calcularon con un análisis de ANOVA de dos vías. \*,  $p < 0.05$ . \*\*,  $p < 0.01$ .

La heterogeneidad en la aparición y desarrollo de los tumores dificultó realizar réplicas del experimento anterior para evaluar el efecto antitumoral, por lo cual, se decidió realizar un análisis de supervivencia utilizando el método Kaplan-Meier. En la Figura 5, se observa la curva de sobrevida que se generó para el estudio de tratamiento terapéutico bajo las mismas condiciones. El grupo control de implante presentó la mayor mediana de sobrevida con 35.5 días, esto significa que durante el periodo de observación utilizado se calcula que el 50% de la población dentro de este grupo seguirá con vida hasta ese día. Sin embargo, este grupo no presentó sujetos vivos al final del experimento. El grupo B22 presentó un porcentaje de sobrevida del 25% con 1 sujeto retirado vivo al final del experimento. El grupo NPBA presentó el menor tiempo de sobrevida (34 días), es decir, el menor tiempo durante el periodo de observación donde murieron todos los ratones. A pesar de que las primeras muertes durante el periodo de seguimiento fueron de los ratones inmunizados con la biblioteca AX3 se puede observar que al final del estudio este grupo presentó el mayor porcentaje de sobrevida con 40% y el mayor número de sujetos retirados vivos al final del experimento con 2. La biblioteca AX5 no presentó sobrevivientes al final del periodo de observación.

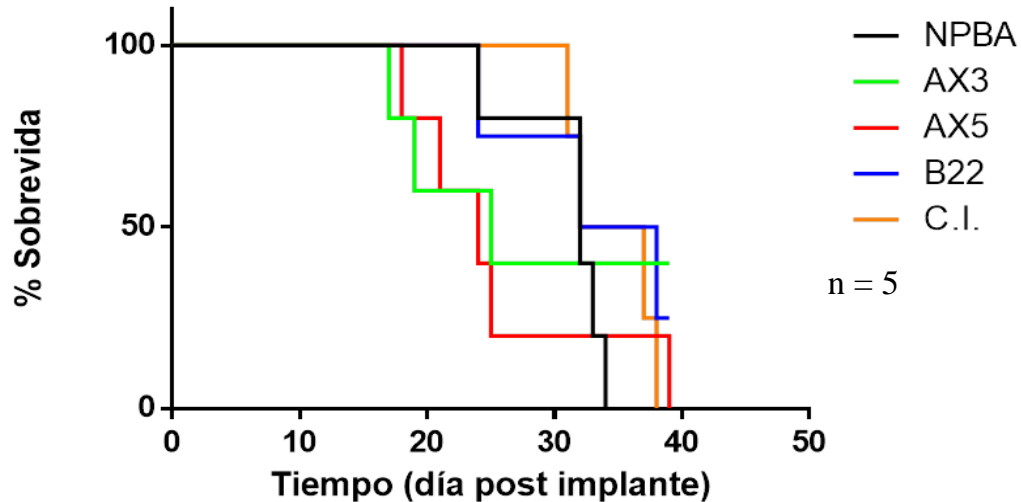


Figura 5. Curva de sobrevida para experimento de tratamiento terapéutico. Se implantaron células B16F10 ( $1 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l) en ratones C57BL/6 al día 0 y se inmunizaron con una dosis única de  $2 \times 10^{12}$  UFC fagos/200  $\mu$ l PBS por vía IV. C.I. = control de implante. B22 = variante no relacionada usada como control negativo. El análisis de sobrevida se realizó mediante el estimador Kaplan-Meier. Prueba Log-rank  $p = 0.52$ .

Se realizó otro experimento de sobrevida, esta vez incluyendo grupos inmunizados con las BMAs (G3D, G5D y NGD) diseñadas para los ratones BALB/c de haplotipo distinto (H-2D<sup>d</sup>). Este experimento surgió de la hipótesis de que no es necesario utilizar un antígeno específico como blanco terapéutico en el caso del cáncer y que el repertorio de antígenos reconocibles por haplotipos distintos puede ser amplio y sobrepuesto. En la Figura 6, se puede ver la curva de sobrevida para este experimento. Al final del experimento, al día 44, los grupos B22, NGD, G3D y G5D presentaron los mismos porcentajes de sobrevida (16 %). El grupo con el mayor porcentaje de sobrevida fue AX5 con 50%, seguido por el control de implante con 33%. El tiempo de sobrevida más corto fue del grupo NPBA con 39 días. Cabe señalar que los grupos AX5 y NGD presentaron los valores más altos de mediana de sobrevida con 42.5 días y 39.5 días, respectivamente.

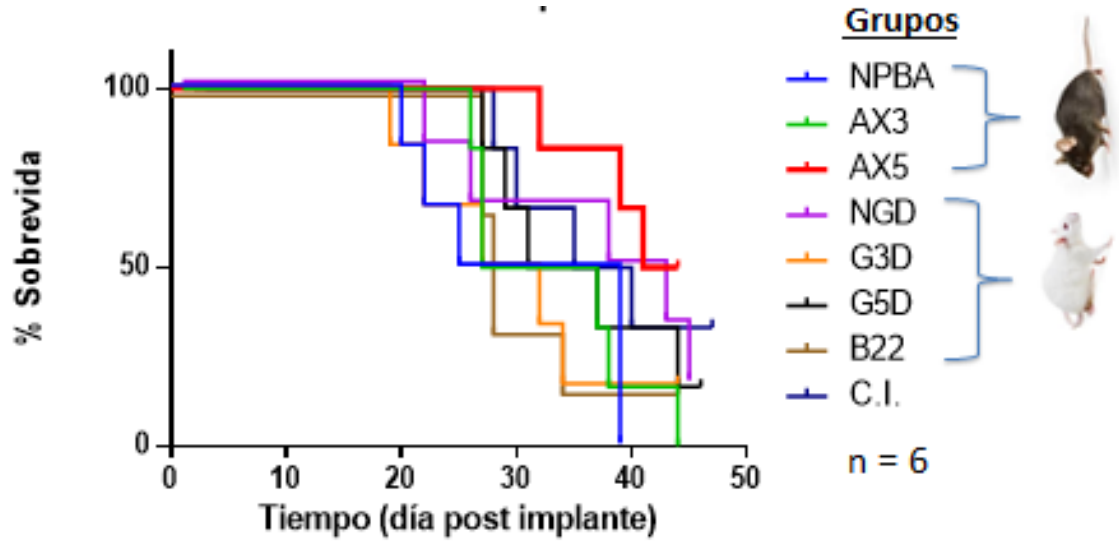


Figura 6. Curva de sobrevida para tratamiento terapéutico. Se implantaron células B16F10 ( $1 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l) en ratones C57BL/6 al día 0 y se inmunizaron con una dosis única de  $2 \times 10^{12}$  UFC fagos/200  $\mu$ l PBS por vía IV. Los grupos NGD, G3D y G5D corresponden a las BMAs diseñadas para los ratones BALB/c de haplotipo diferente. C.I. = control de implante. B22 = variante no relacionada, control negativo. El análisis de sobrevida se realizó mediante el estimador Kaplan-Meier. Prueba Log-rank  $p = 0.4$ .

## DISCUSIÓN

El cáncer se ha convertido en un problema mundial que puede llegar a afectar a cualquier persona sin importancia de factores como edad o sexo. Actualmente, es la segunda causa de muerte en el ser humano a nivel mundial y a pesar de que el 30 a 50% de los cánceres pueden ser prevenidos, actualmente se estima que el número de pacientes diagnosticados con cáncer seguirá aumentando (98).

El diagnóstico temprano de melanoma, antes de que se genere metástasis a distancia, conduce a un mejor pronóstico y las opciones terapéuticas tradicionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía) aún son vigentes. Sin embargo, para los pacientes con melanoma metastásico los tumores son difíciles de tratar y desarrollan resistencia rápidamente a las terapias que actualmente existen (99).

El melanoma es un cáncer de progresión rápida que va generando clonas menos antigénicas mediante la selección inmune, sin embargo se ha visto que el sistema inmune puede ser manipulado para combatir el melanoma y por tal razón este cáncer en particular siempre ha estado en la vanguardia para el desarrollo de tratamientos (100). Ningún otro tumor ha sido investigado con mayor profundidad que el melanoma en el desarrollo de vacunas (101). Debido a su resistencia a quimioterapias y remisiones espontáneas el melanoma ha sido un objetivo principal en el desarrollo de una vacuna contra el cáncer (102). A pesar de más de dos décadas de esfuerzo postulando candidatos para una vacuna contra el melanoma, ya sea utilizando antígenos comunes o en el presente con el uso de neo-antígenos, los resultados siguen teniendo éxito limitado.

La inmunoterapia basada en neo-antígenos busca en algunos casos como señala Swanton *et al.* destacar la importancia de los neo-antígenos clonales, es decir, aquellas mutaciones específicas de tumor que se encuentran en todas las células cancerosas (103). Su propósito es encontrar blancos antigénicos adecuados con el fin de eliminar la mayor cantidad de células cancerosas posibles. Sin embargo, como se ha evidenciado en el estudio TRACERx (vigilancia de la evolución del cáncer a través de terapia) (104), impulsado por el mismo investigador, los tumores presentan heterogeneidad intratumoral diseminada en cuanto a la presentación de mutaciones, donde la mayoría de los neo-antígenos resultan ser subclonales, es decir, están presentes en un subgrupo de células cancerosas.

Subbotin ha llegado a la misma conclusión, la cual establece que la falta de respuestas anticipadas en inmunoterapias contra cáncer es debido a que las células cancerosas mutan constantemente, mientras que los antígenos utilizados en inmunoterapias son antigénicamente estáticos, en conclusión, no se puede eliminar el cáncer quedándose un paso atrás (105). Además, se ha visto que los linfocitos T constantemente están retrasados con respecto a las mutaciones de los epítomos (106). Debido a la situación de inestabilidad antigénica, se ha sugerido que serán necesarios avances tecnológicos para entender mejor la evolución de los tumores e intentar predecir los pasos que puedan seguir (107). Todo ello aumentará el nivel de complejidad al conocimiento de la genómica y evolución de cáncer sin tomar en cuenta primero los conceptos básicos pero profundos que se conocen de esta enfermedad, principalmente que el cáncer muta constantemente de manera impredecible y de tal manera evita ser eliminado.

En este trabajo se utilizó el novedoso concepto de bibliotecas de mimótopos de alaninas (BMAs) para generar un tratamiento contra el cáncer. Las BMAs son una modificación del concepto utilizado por el equipo de investigación, el cual se denomina bibliotecas de epítomos variables (BEVs). En nuestro grupo de investigación ya se ha comprobado que la inmunización con BEVs generadas a partir de un epítomo de survivina tiene efecto anti tumoral en condiciones profilácticas y terapéuticas en un modelo de adenocarcinoma mamario. La survivina es un antígeno asociado a tumores que se sobreexpresa en diferentes tipos de cánceres. Las BEVs se generan a partir de antígenos definidos y a pesar de que se generan miles de variantes a partir de un solo epítomo, se ha visto que la pérdida de antígenos en las células cancerosas puede resultar en la pérdida de reactividad de los linfocitos T antígeno específico (108-109).

Considerando el problema fundamental de la inestabilidad genómica y antigénica en el cáncer se diseñaron las BMAs sin restricción a alguna secuencia antigénica definida. El repertorio de linfocitos T estimulados por las BMAs no sería afectado por la pérdida de un antígeno en particular. El uso de BMAs podría estimular una respuesta contra antígenos tumorales que aún no han sido presentados a linfocitos T citotóxicos, ya que como comprobó Stronen *et al.* (2016), existe un repertorio de neoantígenos dentro de los tumores para los cuales esta población celular no ha montado una respuesta inmune (110).



Aunque el principal objetivo en la generación de una vacuna contra el cáncer es analizar su efecto en condiciones terapéuticas o profilácticas es importante conocer el potencial inmunogénico en ausencia de enfermedad.

Se pudo observar que al inmunizar con las bibliotecas AX3 y AX5 y posteriormente estimular los esplenocitos CD3<sup>+</sup> provenientes de estos grupos con antígenos diferentes se generaron los más altos porcentajes de proliferación a diferencia de los resultados del grupo inmunizado con la secuencia NPBA (ver Figura 3). En el grupo inmunizado con NPBA se puede ver que no solamente los esplenocitos CD3<sup>+</sup> no proliferan en altos porcentajes en comparación con los grupos AX3 y AX5 sino que no son capaces de proliferar cuando estas células son estimuladas con el mismo antígeno para el cual fueron seleccionadas. Bajo estas condiciones no patológicas y experimento *in vitro*, se puede ver la poca inmunogenicidad de esta secuencia fija. En consecuencia, esto nos condujo a preguntarnos si se pudieran obtener resultados similares bajo condiciones de enfermedad dado que en el fenómeno de “Pecado Original Antigénico” inducido por el uso de inmunógenos de secuencia antigénica definida, existe la probabilidad de que se inhiba la activación de células T al encontrarse con antígenos ligeramente distintos (111).

El alto porcentaje de proliferación inesperado por el control G3D probablemente se deba al solapamiento en el repertorio de péptidos reconocidos por diferentes haplotipos como se ha visto en humanos para la molécula MHC-I y MHC-II (112-113). La biblioteca G3D, la cual también es una BMA diseñada para haplotipo diferente, mantiene las 3 posiciones (2, 3 y 9) de anclaje a la molécula MHC-I. La biblioteca AX5 tiene estas posiciones, 2 y 3, mutadas y en la posición 9 tiene el mismo aminoácido de anclaje (leucina) que G3D. Es posible que existan variantes dentro de la biblioteca AX5 que contengan en esas dos posiciones, 2 y 3, aminoácidos que correspondan a los de anclaje para el haplotipo H2-Dd y por ende proliferan las células CD3<sup>+</sup> al ser estimuladas con la biblioteca G3D.

Los resultados de inmunogenicidad demuestran: 1) el potencial inmunogénico que presentan las BMAs sobre la secuencia NPBA, al presentar mayores porcentajes de proliferación. 2) La posibilidad de generar inmunógenos con base en una secuencia que no codifica para algún epítipo conocido. 3) El riesgo de utilizar un inmunógeno de secuencia definida que no proviene de un antígeno conocido.

Los resultados de inmunogenicidad sugieren que a pesar de que las bibliotecas AX3 y AX5 no tienen relación con algún antígeno conocido si pueden ser reconocidas por el sistema inmune.

Consecuentemente, el siguiente experimento llevado a cabo bajo condiciones de enfermedad demostró el efecto antitumoral de las bibliotecas AX3 y AX5. Este efecto, visto como inhibición del crecimiento tumoral fue estadísticamente significativo en la biblioteca AX3 con respecto a la secuencia nominal, donde se observa que AX3 generó tumores 8 veces más pequeños que la secuencia nominal. Lo más sorprendente es que se obtuvieron estos resultados con una sola inmunización ya que se conoce que una vacuna efectiva usualmente requiere más de una administración en forma de prime-boost (114). Inclusive, la terapia oncolítica viral T-VEC usada contra melanoma que fue aprobada en el 2015 por la FDA (la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) es administrada cada dos semanas por un mínimo de 6 meses (115). Cabe destacar también la diferencia significativa que existe entre el tamaño de los tumores del control de implante y la secuencia NPBA donde se observa que es preferible que el melanoma lleve a cabo su curso natural en vez de la intervención terapéutica ya que podemos ver que el tumor es 2.4 veces más grande después de la inmunización. La mono-terapia convencional es considerada menos efectiva y ahora se opta por las terapias combinatorias que son fundamentales en la terapia contra cáncer (116). A pesar de que esté arraigada fuertemente esta idea, ya se ha visto por Mansour M *et al.* (2007) la erradicación de tumores establecidos de B16F10 con una sola inmunización de péptidos sintéticos (117).

Los estudios de sobrevida que se realizaron refuerzan los resultados anteriores observados con las BMAs. En enfermedades neoplásicas, pronosticar la supervivencia a largo plazo es de fundamental importancia para la toma de decisiones acerca de la efectividad de la terapéutica y definir cuáles son las más adecuadas (118).

En el primer experimento de sobrevida se puede ver que el grupo inmunizado con la biblioteca AX3 generó los mejores resultados. Se esperaba un resultado así ya que se ha visto que al disminuir el tamaño tumoral aumenta la sobrevida también (119). Lo más importante de estos resultados es el hecho de que fue con un solo agente terapéutico ya que actualmente lo más recomendado es el uso simultáneo de varios agentes terapéuticos. No obstante y a pesar de que muchos diferentes tipos de vacunas han sido probadas en

melanoma metastásico, ningún agente por si solo ha demostrado un beneficio de sobrevida significativo en ensayos clínicos (120). Considerando que muchos de los tratamientos disponibles buscan aumentar la esperanza de vida de los pacientes con melanoma metastásico, que es muy bajo (15-20% a 5 años), los resultados obtenidos de la biblioteca AX3 son prometedores.

Los resultados del siguiente experimento de sobrevida demuestran un mayor porcentaje de sobrevida que lo alcanzado anteriormente, sin embargo fue producto de la inmunización con la biblioteca AX5. Los tumores no son antigénicamente estáticos y como se ha comprobado puede haber pérdida de antígenos en lesiones tumorales secuenciales lo cual podría explicar por qué la biblioteca AX5 obtuvo mejores resultados en este segundo experimento y la biblioteca AX3 no presentó sobrevivientes al final del experimento.

Los resultados anteriores se pueden atribuir también a las propiedades intrínsecas de la línea celular B16F10 ya que se sabe que es inestable y puede generar variantes rápidamente (97). Esta línea celular es un modelo singénico tumoral usado frecuentemente y se ha destacado por ser poco inmunogénico y difícil de tratar (121).

En este trabajo propusimos una novedosa inmunoterapia en cáncer que se podría utilizar para combatir la evasión y supresión del sistema inmune en el microambiente tumoral al utilizar BMAs que se asemejan a los epítomos que se podrían encontrar en los tumores. La disminución del tamaño tumoral y aumento en el porcentaje de sobrevida en dos experimentos separados sugiere que dentro de las BMAs utilizadas, la mejor opción como tratamiento terapéutico es la biblioteca AX3. Sin embargo, se necesitan más repeticiones y condiciones más controladas para verificar esto.

## CONCLUSIÓN

Las BMAs diseñados sin restricción a alguna secuencia antigénica conocida fueron reconocidas por el sistema inmune en pruebas de inmunogenicidad.

Las inmunizaciones terapéuticas con las BMAs AX3 y AX5 demostraron tener efecto sobre el crecimiento tumoral y aumentar el porcentaje de supervivencia con respecto a la secuencia nominal de secuencia definida después de una sola administración.

## PERSPECTIVAS

El presente estudio generó datos preliminares del primer uso de las bibliotecas de mimótopos de alaninas en un modelo murino de melanoma. Los resultados demuestran el efecto de un tratamiento terapéutico en contra del melanoma que nosotros consideramos un inmunógeno universal en contra del cáncer y que además, podría servir en contra de patógenos antigénicamente variables.

La evidencia presentada demuestra la necesidad de futuros experimentos donde además del seguimiento del crecimiento y peso tumoral será importante fenotipificar y cuantificar la respuesta inmune que se está generando ya que se conoce que la presencia de ciertos tipos celulares en los tumores y en los focos metastásicos es evidencia de un mejor pronóstico para los pacientes con melanoma. Con el fin de generar resultados contundentes es necesario utilizar el modelo de melanoma en condiciones metastásicas ya que para este estadio no existe un tratamiento efectivo.

Además del presente modelo tumoral de melanoma utilizado en este trabajo sería recomendable aplicar estos inmunógenos en otros tipos de cáncer, particularmente aquellos conocidos por tener altas cargas mutacionales como el cáncer pulmonar.

Conforme a los resultados generados al utilizar antígenos no relacionados se podría hacer una exploración en la especificidad de los antígenos reconocidos por haplotipos definidos lo cual podría abrir fronteras en lo que conocemos de la inmunología.

Sería fundamental utilizar un formato de esta terapia que se utilice como péptido sintético, el cual se utiliza ampliamente en la inmunoterapia en cáncer, o incluso la terapia génica ya que la terapia con fagos no está permitida en humanos.

## REFERENCIAS

1. American Cancer Society, 2017. Cancer Facts and Figures 2017. Genes and Development, 21(20), pp.2525–2538.
2. Burton, Z.F., 2018. Chapter 41 - Human Cancer. In Z. F. B. T.-E. S. C. Burton, ed. Academic Press, pp. 165–167.
3. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer. Cancer.org. 2018 [cited 18 October 2018]
4. Secretaria de Salud, (2011). Perfil Epidemiológico de los Tumores Malignos en México. Mexico Distrito Federal: pag 77, 83
5. Glazer AM, Winkelmann RR, Farberg AS, Rigel DS. Analysis of Trends in US Melanoma Incidence and Mortality. JAMA Dermatology. 2017; 153(2):225.
6. Melanoma of the skin statistics | Melanoma of the skin [Internet]. Melanoma.canceraustralia.gov.au. 2018 [cited 18 October 2018].
7. Survival Rates for Melanoma Skin Cancer, by Stage [Internet]. Cancer.org. 2018 [cited 18 October 2018].
8. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature. 2012;481(7381):306–13.
9. Vincent MD. The animal within: Carcinogenesis and the clonal evolution of cancer cells are speciation events sensu stricto. Evolution (N Y). 2010;64(4):1173–83.
10. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. Nature. Nature Publishing Group; 2009;458(7239):719–24.
11. Chakravarthi BVSK, Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology; 2016;186(7):1724–35.
12. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz L a, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. Science (80- ). 2013;339(6127):1546–58.
13. Cancer. World Health Organization. 2018 [cited 12 May 2018].
14. Robert Weinberg: Beyond Hallmarks. Trends in Cancer. 2015;1(1):4-5.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57–70.
16. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res. 2017; 7(5): 1016–36.
17. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. Genes and Cancer. 2011;2(3):344–58.
18. 1. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(5):1–12.
19. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. Trends in Cell Biology. 2013;23(12):620-633.
20. Fincham JRS. Telomeres. In: Encyclopedia of Genetics. 2001. p. 1946–50.
21. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. Genome Med. Genome Medicine; 2016;8(1).
22. Ono M, Kuwano M. Tumor angiogenesis as a target for cancer therapy. Biotherapy. 2001;15(6):669–76.
23. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. Elsevier Inc.; 2011. p. 646–74.

24. Odenthal J, Takes R, Friedl P. Plasticity of tumor cell invasion: Governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis*. 2016;37(12):1117–28.
25. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2015; 35:S244–75.
26. Andor N, Maley CC, Ji HP. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. *Cancer Res*. 2017;77(9):2179–85.
27. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science* (80- ). 2013; 339:286–92.
28. Burnet M. Cancer--A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. *BMJ*. 1957;1 (5023):841-847.
29. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121 (1):1–14.
30. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8.
31. Boon T. Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*. 1994;12 (1):337-365.
32. Van Der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van Den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* (80- ). 1991;254(5038):1643–7.
33. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol [Internet]*. 2004;22(1):329–60.
34. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2015; 27:16–25.
35. Mahmoud F, Shields B, Makhoul I, Avaritt N, Wong HK, Hutchins LF, et al. Immune surveillance in melanoma: From immune attack to melanoma escape and even counterattack. *Cancer Biol Ther*. Taylor & Francis; 2017;18(7):451–69.
36. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. Elsevier Ltd; 2015; 35:S185–98.
37. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (80- ). 2011;331(6024):1565–70.
38. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. Elsevier Ltd; 2016; 39:44–51.
39. Poggi A, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape: Role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp*. 2006;54(5):323–3
40. Melanoma Treatment Regimens. *Cancer Therapy Advisor*. 2018 [cited 22 October 2018].
41. Herzberg B, Fisher DE. Metastatic melanoma and immunotherapy. *Clin Immunol*. Elsevier Inc.; 2016; 172:105–10.
42. Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage. *Cancer.org*. 2018 [cited 10 April 2018].
43. Cancer Immunotherapy. *Cancer.org*. 2018 [cited 23 October 2018].

44. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol.* 2013;(31):443–73.
45. Jago CB, Yates J, Saraiva Câmara NO, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(3):463–71.
46. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-MEDIATED INHIBITION IN REGULATION OF TCELL RESPONSES: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2001;19(1):565–94.
47. Nakamura K, Okuyama R. Immunotherapy for advanced melanoma: Current knowledge and future directions. Vol. 83, *Journal of Dermatological Science.* Japanese Society for Investigative Dermatology; 2016. p. 87–94.
48. Kleffel S, Zhan Q, Juneja VR, Kupper TS, Posch C, Hoetzenecker W, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell.* 2015;162(6):1242–56.
49. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98–106.
50. Rausch M, Hastings K. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Melanoma: From Basic Science to Clinical Application. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* 2017; 121-142.
51. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med.* 2018;378(2):158–68.
52. Califano R, Lal R, Lewanski C, Nicolson MC, Ottensmeier CH, Popat S, et al. Patient selection for anti-PD-1/PD-L1 therapy in advanced non-small-cell lung cancer: Implications for clinical practice. *Futur Oncol.* 2018;14(23):2415–31.
53. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol.* Elsevier Ireland Ltd; 2017;115:36–49.
54. Brennick CA, George MM, Corwin WL, Srivastava PK, Ebrahimi-Nik H. Neoepitopes as cancer immunotherapy targets: key challenges and opportunities. *Immunotherapy.* 2017;9(4):361–71.
55. GlaxoSmithKline throws in towel on lung cancer vaccine trial. U.S. 2018 [cited 25 October 2018]. Available from: [s://www.reuters.com/article/us-gsk-cancer/glaxosmithkline-throws-in-towel-on-lung-cancer-vaccine-trial-idUSBREA310E420140402](https://www.reuters.com/article/us-gsk-cancer/glaxosmithkline-throws-in-towel-on-lung-cancer-vaccine-trial-idUSBREA310E420140402)
56. Shigehisa Kitano AI. Cancer Neoantigens: A Promising Source of Immunogens for Cancer Immunotherapy. *J Clin Cell Immunol.* 2015;06(02):1–7.
57. Hellmann MD, Snyder A. Making It Personal: Neoantigen Vaccines in Metastatic Melanoma. Vol. 47, *Immunity.* Elsevier Inc.; 2017. p. 221–3.
58. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology.* Nature Publishing Group; 2018. p. 81–94.
59. Aquino T, Nunes A. Host immunity and pathogen diversity: A computational study. *Virulence.* 2016;7(2):121–8.
60. Servín-Blanco R, Zamora-Alvarado R, Gevorkian G, Manoutcharian K. Antigenic variability: Obstacles on the road to vaccines against traditionally difficult targets. *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12(10):2640–8.



61. Pedroza-Roldan C, Saavedra R, Govezensky T, Charles-ni C, Vaca L, Avannis-aghajani E, et al. Variable epitope library-based vaccines: Shooting moving targets. *Mol Immunol.* 2009;47:270–82.
62. Francis, T., Jr (1960) On the doctrine of original antigenic sin. *Proc. Am. Philos. Soc.* 104, 572–578
63. Kim J, Davis W, Sambhara S, Jacob J. Strategies to alleviate original antigenic sin responses to influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(34):13751-13756.
64. Henry C, Palm AE, Krammer F, Wilson PC. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. *Trends Immunol.* Elsevier Ltd; 2017;xx:1–10.
65. Sharma S, Thomas PG. The two faces of heterologous immunity: protection or immunopathology. *J Leukoc Biol.* 2014;95(3):405–16.
66. Linderman SL, Hensley SE. Antibodies with ‘Original Antigenic Sin’ Properties Are Valuable Components of Secondary Immune Responses to Influenza Viruses. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):1–19.
67. Singh R a. K, Rodgers JR, Barry M a. The Role of T Cell Antagonism and Original Antigenic Sin in Genetic Immunization. *J Immunol.* 2002;169(12):6779–86.
68. Henry C, Palm AE, Krammer F, Wilson PC. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. *Trends Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;xx:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.08.003>
69. A new dengue vaccine should only be used in people who were previously infected, WHO says [Internet]. *Science | AAAS.* 2018 [cited 2 May 2018]. Available from: <http://www.sciencemag.org/news/2018/04/new-dengue-vaccine-should-only-be-used-people-who-were-previously-infected-who-says>
70. Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228(4705):1315-1317.
71. Sidhu S. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering.* 2001;18:57-63.
72. Qi H , Lu H, Qiu H PV and LA. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction Huan. *J Mol Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;(417):129–413. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>
73. Smith G P V. Phage Display. *Chem Rev.* 1997;97:391–410.
74. Makowski L. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr Opin Struct Biol.* 1994;4(2):225–30.
75. Vieira J, Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153(1982):3–11.
76. Parkhurst MR, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA. Improved Induction of Melanoma-Reactive CTL with Peptides from the Melanoma Antigen gp100 Modified at HLA-A\*0201 -Binding Residues. *J Immunol.* 1996;157:2539–48.
77. Buhrman JD, Jordan KR, U’ren L, Sprague J, Kemmler CB, Slansky JE. Vaccination by Boosting with Native Tumor Antigens. *Cancer Res.* 2013;73(1):74–85.
78. Chen L. Mimotopes of cytolytic T lymphocytes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(2):219–22.
79. Sharav T, Wiesmüller KH, Walden P. Mimotope vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine.* 2007;25(16 SPEC. ISS.):3032–7.

80. Schaubert KL, Price DA, Salkowitz JR, Sewell AK, Sidney J, Asher TE, et al. Generation of robust CD8+ T-cell responses against subdominant epitopes in conserved regions of HIV-1 by repertoire mining with mimotopes. *Eur J Immunol.* 2010;40(7):1950–62.
81. Yamamura Y, Rivera R, Sunkara D, Kim I-S, Gardner MB, Torres J V., et al. Synthetic Antigens Representing the Antigenic Variation of Human Hepatitis C Virus. *Viral Immunol.* 2010;23(5):497–508.
82. Linnemann T, Tumenjargal S, Gellrich S, et al. Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. *Eur J Immunol.* 2001;31(1):156–65.
83. Singer J, Manzano-Szalai K, Fazekas J, et al. Proof of concept study with an HER-2 mimotope anticancer vaccine deduced from a novel AAV-mimotope library platform. *Oncoimmunology.* 2016;5(7).
84. Adjiri A. DNA Mutations May Not Be the Cause of Cancer. *Oncol Ther. Springer Healthcare;* 2017;5(1):85–101.
85. Noe Dominguez-Romero A, Zamora-Alvarado R, Servín-Blanco R, Perez-Hernández EG, Castrillon-Rivera LE, Munguia ME, et al. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(11):3201–13.
86. de la Cruz F, Lal A MT. Immunogenicity and Epitope Mapping of Foreign Sequences via Genetically Engineered Filamentous Phage. *J Biol Chem.* 1988;263(9):4318–22.
87. Bartolacci C, Andreani C, Curcio C, Occhipinti S, Massaccesi L, Giovarelli M, et al. Phage-Based Anti-HER2 Vaccination Can Circumvent Immune Tolerance against Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2018;2:1486–99.
88. Berardinis P De, Sartorius R, Fanutti C, Perham RN, Pozzo G Del, Guardiola J. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat Biotechnol.* 2000;789:873–6.
89. Morrison KL, Weiss GA. Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5:302–7.
90. Weiss GA, Watanabe CK, Zhong A, Goddard A, Sidhu SS. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(16):8950–4.
91. Greenspan NS. Dimensions of antigen recognition and levels of immunological specificity. *Adv Cancer Res.* 2001;80: 147–87.
92. Ayres CM, Corcelli SA, Baker BM. Peptide and peptide-dependent motions in MHC proteins: Immunological implications and biophysical underpinnings. *Front Immunol.* 2017: 1–9.
93. Servín-Blanco R, Chávaro-Ortiz RM, Zamora-Alvarado R, Martínez-Cortes F, Gevorkian G, Manoutcharian K. Generation of cancer vaccine immunogens derived from major histocompatibility complex (MHC) class I molecules using variable epitope libraries. *Immunol Lett. Elsevier;* 2018;204(October):47–54.
94. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today.* 1998;19(9):395–404.

95. Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive ? *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2012;12(9):669–77.
96. Ignatowicz L, Rees W, Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kushnir E, Kappler J, et al. T Cells Can Be Activated by Peptides That Are Unrelated in Sequence to Their Selecting Peptide. *Immunity*. 1997;7:179–86.
97. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. In: *Current Protocols in Immunology*. 2001. p. 1–33.
98. Cancer prevention [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 28 September 2018]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/en/>
99. Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral Heterogeneity as a Therapy Resistance Mechanism. *Advances in Pharmacology*. 2012;;335-359
100. Maio M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann Oncol*. 2012; 23(SUPPL.8).
101. Ott PA, Fritsch EF, Wu CJ, Dranoff G. Vaccines and Melanoma. Vol. 28, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. Elsevier; 2014. p. 559–69.
102. Terando AM, Faries MB, Morton DL. Vaccine therapy for melanoma: Current status and future directions. Vol. 25, *Vaccine*. 2007.
103. McGranahan N, Furness AJ RR. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Tumor Immunol*. 2016;351(6280):1463–70.
104. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Mcgranahan N. Tracking the Evolution of Non–Small–Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2109–21.
105. Subbotin VM. Dendritic cell-based cancer immunotherapy: the stagnant approach and a theoretical solution. *Drug Discov Today*. Elsevier Ltd; 2014;19(7):834–7.
106. Balamurugan A, Claiborne D, Ng HL, Yang OO. HIV-1 Epitope Variability Is Associated with T Cell Receptor Repertoire Instability and Breadth. *J Virol*. 2017;91(16):e00771-17.
107. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. Elsevier Inc.; 2017;168(4):613–28.
108. Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, Niknafs N, Bhattacharya R, White J, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2017;7(3):264–76.
109. Verdegaal EME, De Miranda NFCC, Visser M, Harryvan T, Van Buuren MM, Andersen RS, et al. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*. Nature Publishing Group; 2016;536(7614):91–5.
110. Strønen E, Toebes M, Kelderman S, Buuren MM Van, Yang W, Rooij N Van, et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science* (80- ). 2016; 2288:1–11.
111. Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature*. 1998;394:482–5. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: A revised and updated classification. *BMC Immunol*. 2008;9: 1–15.
112. Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*. 2011;63(6):325–35.

113. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: A revised and updated classification. *BMC Immunol.* 2008;9:1–15.
114. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(3):346–51.
115. T-VEC (Imlygic™). Melanoma Research Alliance. 2018 [cited 25 October 2018]. Available from: <https://www.curemelanoma.org/patient-eng/melanoma-treatment/immunotherapy/t-vec-imlygic/>
116. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget.* 2015;8(23):38022–43.
117. Mansour M, Pohajdak B, Kast WM, Fuentes-Ortega A, Korets-Smith E, Weir GM, et al. Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax®. *J Transl Med.* 2007;5:1–8.
118. Arribalzaga EB. Interpretación de las curvas de supervivencia: Interpretation of survival curves. *Rev Chil Cirugía.* 2007;59 (1):75–83.
119. Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, et al. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of. *PNAS.* 2014;111(32):1–6.
120. Cavalcante L, Chowdhary A, Sosman JA, Chandra S. Combining Tumor Vaccination and Oncolytic Viral Approaches with Checkpoint Inhibitors: Rationale, Pre-Clinical Experience, and Current Clinical Trials in Malignant Melanoma. *Am J Clin Dermatol.* Springer International Publishing; 2018;19(5):657–70.
121. Yu JW, Bhattacharya S, Yanamandra N, Kilian D, Shi H, Yadavilli S, et al. Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments. *PLoS One.* 2018; 13(11):e0206223.