



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**COMBINACIÓN DE ADYUVANTES Y BLOQUEO DE
MECANISMOS INMUNOSUPRESORES COMO
ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN TERAPÉUTICA**

Fernando Aranda Vega

Tesis doctoral

2012



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**COMBINACIÓN DE ADYUVANTES Y BLOQUEO DE
MECANISMOS INMUNOSUPRESORES COMO
ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN TERAPÉUTICA**

Memoria presentada por **D. Fernando Aranda Vega** para aspirar
al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de
Terapia Génica y Hepatología y estimo que puede ser presentado ante el
Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 19 de junio de 2012

Dr. Pablo Sarobe Ugarriza

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca otorgada por la Fundación para la Investigación Médica Aplicada

It's the job that's never started
as takes longest to finish.

J.R.R. TOLKIEN

A mis padres

A mis hermanos

A Olalla

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad de Navarra*, por la formación que en ella he recibido durante todos estos años, tanto a nivel profesional como personal.

Al *Dr. Jesús Prieto* por haberme dado la oportunidad de hacer el doctorado en el departamento de Terapia Génica y Hepatología, y por el entusiasmo que muestra en todos los proyectos.

A mi director de tesis, el *Dr. Pablo Sarobe*, por haberme dado la oportunidad, por confiar en mí desde el principio, por su incansable e incondicional ayuda, por ser el mejor maestro y ejemplo en este mundo de la investigación.

Al *Dr. Juan José Lasarte*, por todos sus consejos y buenas ideas, por toda su ayuda, porque siempre está ahí para resolver cualquier problema.

Al *Dr. Francisco Borrás*, por todo lo que ha significado en nuestro laboratorio, tanto en lo profesional como en lo personal. La sabiduría y humanidad que has sembrado a tus doctorandos continuará durante décadas dando sus frutos.

Al Laboratorio 3.01:

A *Jaione*, por la paciencia y por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio, porque es inevitable no acordarme de tí si vuelvo al principio de la tesis.

A *Diana*, por todo su cariño, ayuda y paciencia. Contigo todo ha sido más fácil. Nunca podré olvidar todo lo que he aprendido y has significado para mí durante estos años.

A *Marta Ruiz*, por siempre animarme y hacerme ver la suerte que tengo. Porque siempre has estado dispuesta a ayudarme y apoyarme.

A *Nancy*, por toda tu ayuda y por el buen rollo que teníamos, te he echado mucho de menos este último año. Siempre te recordaré con mucho cariño.

A la rubia natural, *Super-Isiar*, por ser una gran compañera de laboratorio, siempre estar atenta y ayudarme con lo que hiciera falta. Te deseo lo mejor para el futuro.

A *Leyre*, porque te mereces un monumento!! sin tí hubiera llegado al caos en muchas ocasiones. Para mí eres uno de los pilares para que el laboratorio funcione a la perfección.

A *Vir*, por su confianza, por sus ánimos, por su alegría... por ser como eres: única.

A *Javi*, por estar dispuesto siempre a ayudar, a hacerme reír, a desconectar... ha sido un placer haberte conocido.

A *Iñaki*, por la alegría que nos transmites a todos, una de las mejores personas que he conocido durante estos años.

A *Aintzane*, por las risas que nos echamos para desconectar y por todos tus consejos, has sido un gran apoyo en mis momentos de bajón, gracias por haberme aguantado.

A *Esperanza*, por confiar en mí con los experimentos de su artículo y por su amabilidad.

A *Natalia*, por el año que pasaste con nosotros en el laboratorio.

Al Laboratorio 3.02:

A *Laura y Noelia*, por estar siempre dispuestas a ayudarme y por vuestro cariño, siempre tendré un buen recuerdo de vosotras.

A *Maika*, por tu ayuda y sentido del humor, me he divertido mucho contigo y me has demostrado que eres una gran persona.

A *Lorea, Teresa y Marta*, por recibirme con los brazos abiertos cada vez que voy a vuestro laboratorio.

A todos los demás que me habéis ayudado o hemos coincidido durante estos años: *Jose Ignacio, Mansilla, Kepa, Josetxo, Asís, Juantxo, Manuela, Fran, Pepe, Axel, Javi, Dani, Josemi, Carlos Barea, Jorge Cerveró, Itxi pitxi, Sarita, María, Marta Martínez, Gurbindo, Jambo, Docampo, al resto del laboratorio 3.02, al laboratorio 3.03, al laboratorio 1.01, Miriam, Machio, Natalia, Eneko, Ana Baltanás, Pablo Robador, Diego, Cris, Eva, Estela* y muchos más, gracias!

A mi gran amigo, hermano, *el Lobo*, por todos estos años de complicidad, por saber que tengo un tesoro que muchos no pueden presumir en los tiempos que corren y es tener un amigo de verdad. También a su esposa y amiga mía *Paola*, por ser un encanto.

A mis amigos de canarias, pocos pero los que serán para siempre: *Jose, Pablo, Raúl, Dani*, Coe y con todos los que juego al fútbol.

A *Chu, Roberto, Ivo, Nadia, Ivito y Millán*, por cuidarme y tratarme como uno más de la familia.

A mi *Tierra Canaria*, por su cultura, por su pueblo, por ralentizar el tiempo y cambiar el agobio en relax, porque eres y serás mi exilio y mi descanso.

A mis hermanos *David y Dani*, por todo el cariño que os tengo y no os he podido demostrar estando tan lejos. Siempre estaré para ayudaros y apoyaros en lo que haga falta. Os quiero!

A la luz de mi vida, a mi trozo de cielo, por las ilusiones de futuro juntos, por saber aguantarme y entenderme en mis días buenos y no tan buenos, por ser la persona que sabe como llenarme la alegría, por todo lo que significas para mí soy feliz junto a ti *Olalla*.

A mis *padres*, por todo el sacrificio que habéis hecho a lo largo de vuestra vida para que no me falte de nada, por todos los valores que me habéis enseñado, por la educación, por todo vuestro cariño y apoyo, por los recuerdos diarios que tengo de vosotros y las ganas que tengo de volver a veros, por hacerme sentir una persona afortunada, por todo lo que soy, siempre os he tenido, os tengo y os tendré en mí corazón. Te quiero *Mamá*. Te quiero *Papá*.

ÍNDICE

4.3.2.1.c. Macrófagos asociados al tumor (TAM).....	40
4.3.2.1.d. Células dendríticas	41
4.3.2.2. Factores solubles	42
4.3.2.2.a. TGF- β	42
4.3.2.2.b. IL-10.....	43
4.3.2.3. Otros mecanismos	44
5. ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA	45
5.1. Inmunopotenciación	45
5.1.1. Adyuvantes	46
5.1.2. Proteínas recombinantes de fusión basadas en el dominio extra A de la fibronectina (EDA)	47
5.2. Inhibición de los mecanismos inmunosupresores.....	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. LÍNEAS CELULARES	57
1.1. Análisis de la expresión del antígeno tumoral OVA en líneas celulares	58
1.2. Análisis de la expresión de moléculas de MHC en líneas celulares	59
2. ANTÍGENOS.....	59
2.1. Péptidos.....	59
2.2. Proteínas.....	60
3. RATONES.....	61
4. ENSAYOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS	61
4.1. Diferenciación de células dendríticas de ratón a partir de precursores de médula ósea.....	61
4.2. Estudio de las propiedades de las células dendríticas	63
4.2.1. Estimulación <i>in vitro</i> de las células dendríticas	63
4.2.1.1. Producción de citoquinas	63
4.2.1.2. Análisis de la expresión de RNAm	63
4.2.2. Análisis <i>ex vivo</i> de la maduración de las células dendríticas	64
5. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA	65
5.1. Inmunizaciones	65
5.1.1. Combinación de antígeno y adyuvantes	65

5.1.2. Bloqueo de IL-10	65
5.2. Estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la respuesta inmunitaria inducida	66
5.2.1. Aislamiento de células linfoides	66
5.2.2. Inmunidad adaptativa: Respuesta de Linfocitos T	66
5.2.2.1. Producción de citoquinas	66
5.2.2.2. Actividad lítica	68
5.2.2.2.a. Ensayos de lisis <i>in vivo</i>	68
5.2.2.2.b. Expresión de CD107	69
5.2.2.3. Determinación del número de LT específicos de antígeno con tetrámeros	69
5.2.3. Inmunidad innata	69
5.2.3.1. Células NK	69
5.2.4. Células inmunosupresoras	70
5.3. Análisis <i>in vivo</i> de la respuesta inmune antitumoral	70
5.3.1. Inmunidad profiláctica	70
5.3.2. Inmunidad terapéutica	71
5.4. Extracción de tumores y análisis	72
5.4.1. Expresión de RNAm OVA en tumores tratados	72
5.4.2. Niveles de citoquinas intratumorales	72
5.4.3. Análisis por citometría de flujo	73
5.5. Ensayos de depleción <i>in vivo</i> de células NK y linfocitos CD8	73
6. ESTADÍSTICA.....	73
RESULTADOS	75
1. INMUNOTERAPIA BASADA EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA EN UN MODELO TUMORAL POCO INMUNOGÉNICO	77
1.1. Modelo tumoral de melanoma B16-OVA	77
1.2. Inmunoterapia con adyuvantes: Un agonista de TLR más anticuerpos agonistas del CD40.....	78
1.2.1. Tratamiento de ratones con tumor	79
1.2.2. Inducción de la respuesta inmunitaria innata	80
1.2.3. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa	81
1.3. Inmunoterapia con adyuvantes más antígeno tumoral exógeno	82
1.3.1. Tratamiento de ratones con tumor	83

1.3.2. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa	85
1.4. Inmunoterapia basada en la combinación múltiple de adyuvantes y vehiculización del antígeno.....	87
1.4.1. Inducción de la respuesta inmunitaria innata	87
1.4.1.1. Análisis de la activación de las células dendríticas	87
1.4.1.2. Análisis de la activación de células NK	90
1.4.2. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa.....	91
1.4.2.1. Efectos cuantitativos	92
1.4.2.2. Efectos cualitativos.....	94
1.4.2.3. Inmunidad antitumoral.....	97
1.4.2.4. Tratamiento de ratones con tumor	100
1.4.3. Respuestas frente a otros antígenos del tumor	103
1.5. Combinación de EDA-Ag + MAC en el tratamiento de otros tumores.....	106
1.5.1. Actividad y eficacia antitumoral de la proteína EDA-TRP2	107
2. POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA MEDIANTE EL BLOQUEO DE CITOQUINAS INMUNOSUPRESORAS.....	109
2.1. Efecto de la inhibición del TGF- β en la inmunoterapia	109
2.1.1. Producción de TGF- β en tumores B16-OVA	109
2.1.2. Potenciación de la inmunoterapia.....	110
2.1.2.1. Inmunidad innata	111
2.1.2.2. Inmunidad adaptativa.....	111
2.1.3. Respuesta antitumoral	112
2.2. Efecto de la inhibición de la IL-10 en la inmunoterapia	115
2.2.1. Efecto de los péptidos inhibidores de IL-10: P9 y P13.....	116
2.2.2. Potenciación de la inmunoterapia con el anticuerpo anti-receptor de IL-10....	120
2.2.2.1. Efecto sobre la vacunación en ratones <i>naïve</i>	121
2.2.2.2. Efecto en el tratamiento de tumores	123
2.2.2.3. Efecto sobre la respuesta inmunitaria inducida en ratones con tumor.....	124
2.3. Combinación de EDA-OVA+MAC con el bloqueo de IL-10	126
2.3.1. Inmunidad adaptativa	128
2.3.2. Tratamiento tumoral	130

DISCUSIÓN	133
1. INMUNOTERAPIA BASADA EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN UN MODELO TUMORAL POCO INMUNOGÉNICO	136
2. POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA MEDIANTE EL BLOQUEO DE CITOQUINAS INMUNOSUPRESORAS	142
2.1. Bloqueo del TGF- β	143
2.2. Bloqueo de IL-10	144
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXOS	177

ABREVIATURAS

αCD8:	Anticuerpo anti-CD8
αCD40:	Anticuerpo anti-CD40
αIL10R:	Anticuerpo anti-receptor de IL-10
αNK1.1:	Anticuerpo anti-NK
αTGF-β:	Anticuerpo anti-TGF- β
Aa:	Aminoácido
AEC:	3-amino-9-etilcarbazol
Ag:	Antígeno
APC:	Alofococianina (del inglés <i>Allophycocyanin</i>)
BSA:	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD:	Célula dendrítica
CD40L:	Ligando de CD40
CFSE:	Carboxifluorescein succinimidil éster
COX- 2:	Ciclooxigenasa 2
CPA:	Célula presentadora de antígeno
CpG:	Regiones de ADN viral o bacteriano ricas en pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos
CTLA- 4:	Antígeno-4 del linfocito T citotóxico (del inglés <i>Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen 4</i>)
DNA:	Ácido desoxiribonucleico (del inglés <i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DTc:	Determinante T citotóxico
DTh:	Determinante T helper
EDA:	Dominio extra A de la fibronectina (del inglés <i>Extra domain A</i>)
FBS:	Suero fetal bovino (del inglés <i>Foetal Bovine Serum</i>)
FITC:	Fluorescein isotiocianato (del inglés fluorescein isothiocyanate)
FoxP3:	Factor de transcripción forkhead box P3
GFP:	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green fluorescent protein</i>)
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés <i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
HLA:	Antígeno leucocitario humano (del inglés <i>Human leukocyte antigen</i>)
i.d.:	Intradérmico
IDO:	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
Imiq:	Imiquimod

<i>i.p.:</i>	Intraperitoneal
IT:	Inmunoterapia
<i>i.v.:</i>	Intravenoso
IVK:	Ensayo de lisis <i>in vivo</i> (del inglés <i>In vivo killing</i>)
LAP:	Péptido asociado a la latencia (del inglés <i>Latency-associated peptide</i>)
LB:	Linfocitos B
LNC:	Células del nódulo linfoide (del inglés <i>Lymph node cells</i>)
LPS:	Lipopolisacárido
LTc:	Linfocito T citotóxico
LTh:	Linfocito T helper
MAC:	Combinación múltiple de adyuvantes (del inglés <i>Multiple adjuvant combination</i>)
MC:	Medio completo
mCD:	Células dendríticas mieloides
MDSC:	Células Mieloides supresoras (del inglés <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MFI:	Intensidad media de fluorescencia (del inglés <i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés <i>Major histocompatibility complex</i>)
MyD88:	Factor de diferenciación mieloides 88 (del inglés <i>Myeloid differentiation factor 88</i>)
NF-κB:	Factor de transcripción nuclear kappa de los linfocitos B (del inglés <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK:	Célula asesina natural (del inglés <i>Natural killer</i>)
NKT:	Linfocitos T asesinos naturales (del inglés <i>Natural killer T lymphocyte</i>)
NO:	Óxido nítrico (del inglés <i>Nitric Oxide</i>)
NOS:	Óxido nítrico sintasa (del inglés <i>Nitric oxide synthase</i>)
NT:	No tratado
OVA:	Ovalbúmina
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS:	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>)
pCD:	Células dendríticas plasmacitoides
PD-1:	Muerte programada 1 (del inglés <i>Programmed Death-1</i>)

PD-L1:	Ligando 1 de PD
PE:	Ficoeritrina (del inglés <i>Phycoerythrin</i>)
poly (I:C):	Ácido poliinosínico policitidílico
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>Pattern recognition receptors</i>)
RNA:	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic acid</i>)
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
s.c.:	Subcutánea
SFC:	Células formadoras de puntos (del inglés <i>Spots forming cells</i>)
TAM:	Macrófago asociado al tumor (del inglés <i>Tumor associated macrophage</i>)
TAP:	Proteína asociada al transporte (del inglés <i>Transporter associated protein</i>)
TCR:	Receptor de células T (del inglés <i>T cell receptor</i>)
TILs:	Linfocitos infiltrantes del tumor (del inglés <i>Tumor infiltrating Lymphocytes</i>)
TLR:	Receptores tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptors</i>)
TNF:	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumor necrosis factor</i>)
Treg:	Células T reguladoras
TRP2:	Proteína 2 relacionada con la tirosinasa (del inglés <i>Tyrosinase-related protein-2</i>)
VEGF:	Factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés <i>Vascular endothelial growth factor</i>)

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES

A lo largo de los años las enfermedades crónicas causadas por agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos, parásitos) e incluso las enfermedades tumorales, han desatado un gran interés en la investigación biomédica relacionada con la inmunología. Actualmente, los avances conceptuales y tecnológicos en el conocimiento y caracterización de la respuesta inmunitaria han permitido un nuevo entendimiento de las interacciones celulares y moleculares entre el sistema inmunitario y los diferentes agentes patogénicos, lo que podría ayudar a desarrollar nuevas **estrategias de inmunoterapia**.

En este contexto, la respuesta inmunitaria que se presenta más efectiva estaría basada en generar un buen equilibrio y una oportuna interacción entre el sistema inmunitario **innato** y el sistema inmunitario **adaptativo**. Así, normalmente los antígenos son presentados por las células dendríticas a las células T CD4, que a su vez coordinan con los linfocitos T CD8 citotóxicos y los anticuerpos producidos por las células B (Banchereau *et al.* 2005). Estas poblaciones, junto con la respuesta celular mediada por las células NK son trascendentales para el control de este tipo de enfermedades (Fernandez *et al.* 1999; Crowe *et al.* 2005).

No obstante, se ha demostrado que en las infecciones crónicas y tumores, los patógenos que causan estas enfermedades son poco inmunogénicos o en aquellos casos en los que presentan una cierta inmunogenicidad, promueven mecanismos capaces de inhibir al sistema inmunitario efector. Esto es debido en gran parte a que se crea un ambiente tolerogénico promovido por la activación, expansión y migración de ciertos tipos de células reguladoras capaces de suprimir la respuesta inmunitaria, tales como linfocitos T reguladores (Zou 2006), células mieloides supresoras, macrófagos asociados al tumor y distintos subtipos de células dendríticas maduras e inmaduras, que son capaces de producir citoquinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *Transforming growth factor β*) y la interleuquina 10 (IL-10).

Se han estudiado diferentes estrategias para desarrollar terapias basadas en la inducción de respuestas inmunitarias eficaces frente a los agentes que causan estas enfermedades. Estas estrategias están basadas en algunos casos en la administración de antígenos que puedan ser reconocidos por las células T junto con adyuvantes, capaces de activar las células de la inmunidad innata responsables de la presentación antigénica, para potenciar así la respuesta inmunitaria adaptativa. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la **inhibición de los mecanismos inmunosupresores** presentes en este tipo de enfermedades se podría utilizar conjuntamente con las estrategias de **inmunopotenciación**.

2. EL SISTEMA INMUNITARIO

2.1. Inmunidad innata

La respuesta inmunitaria innata constituye la primera línea de defensa frente a los patógenos. Comprende mecanismos bioquímicos y celulares que reconocen y responden a patógenos de forma genérica y rápida. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas (como la piel y el ácido estomacal), proteínas sanguíneas circulantes (proteínas del complemento) y células que reconocen patógenos o sustancias producidas en las infecciones e inician respuestas para eliminarlos. Las poblaciones celulares responsables del desarrollo de una respuesta inmunitaria innata son las células citotóxicas naturales o células NK (del inglés *Natural killer*) y las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CD)). Estas células reconocen estructuras conservadas en los patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*), a través de diferentes receptores de reconocimiento de patrones (**PRR**, del inglés *Pattern recognition receptors*) (Medzhitov 2001; Janeway *et al.* 2002), secretando citoquinas, quimioquinas y capturando antígenos para posteriormente presentarlos, constituyendo un nexo entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa. Dentro de los PRR se encuentran los receptores tipo Toll (**TLR**; del inglés *Toll-Like Receptor*), uno de los grupos de receptores caracterizados inicialmente,

junto con los NLR (nod-like R), RLR (RIG-like R), CLR (C-lectin type R) etc., que tienen un papel fundamental en la activación de la inmunidad innata.

2.1.1. TLR y vías de señalización

Los TLR se localizan en las membranas, principalmente en células del sistema inmunitario y en diferentes células epiteliales (Takeda *et al.* 2003; Kumar *et al.* 2011). Hasta la fecha han sido identificados 12 TLRs en los mamíferos (Beutler 2004; Medzhitov 2007; Kumar *et al.* 2011). Son glicoproteínas integrales de membrana que tienen una estructura característica con un dominio extracelular (N-terminal) y un dominio intracelular (C-terminal). El dominio N-terminal contiene entre 15 - 30 LRR (del inglés *leucine-rich repeats*) y el dominio C-terminal, que se conoce como dominio TIR (del inglés *Toll/Interleukin-1 receptor*), es necesario en la interacción y reclutamiento de varias moléculas adaptadoras para activar la vía de señalización correspondiente.

Cada TLR es activado por un cierto tipo de PAMP. Dependiendo de la naturaleza de estos PAMPs, los TLR se pueden encontrar en la membrana plasmática o en endosomas. TLR1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la membrana plasmática y reconocen principalmente productos bacterianos. Sin embargo, los TLR3, 7, 8 y 9 son endosomales y están especializados en la detección viral y de ácidos nucleicos. Además es posible una comunicación cruzada entre receptores o *cross-linking* al asociarse entre sí o con moléculas adaptadoras, lo que aumenta la especificidad y amplía el patrón de PAMPs reconocidos por un mismo receptor (Kumar *et al.* 2009).

El reconocimiento de los ligandos por parte de los TLR lleva al reclutamiento de varios adaptadores que contienen dominios TIR, como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. La unión de TLR1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9 con sus respectivos ligandos reclutan MyD88. Además, TLR1, 2 y 6 lo hacen a través del adaptador TIRAP, que sirve de unión entre los dominios TIR de los TLR y la molécula MyD88. TLR3 por su parte recluta TRIF. Un caso especial es el del receptor TLR4, ya que es capaz de señalizar a través de ambas vías, ya sea mediante la unión a TIRAP que lleva al reclutamiento de MyD88, o a TRAM

para activar la vía de señalización de TRIF. Cada vía culmina en un patrón de producción de citoquinas diferente. Así, en los TLR presentes en la membrana, la vía de señalización MyD88 culmina en la activación de NF- κ B, con la posterior producción de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) o IL-6. La vía de señalización TRIF estimula la producción de Interferón (IFN) tipo I. Por otro lado, los TLR expresados en endosomas son capaces de estimular tanto la producción de citoquinas proinflamatorias, como la de IFN tipo I a través de MyD88 (Akira 2011) (**Figura I1**).

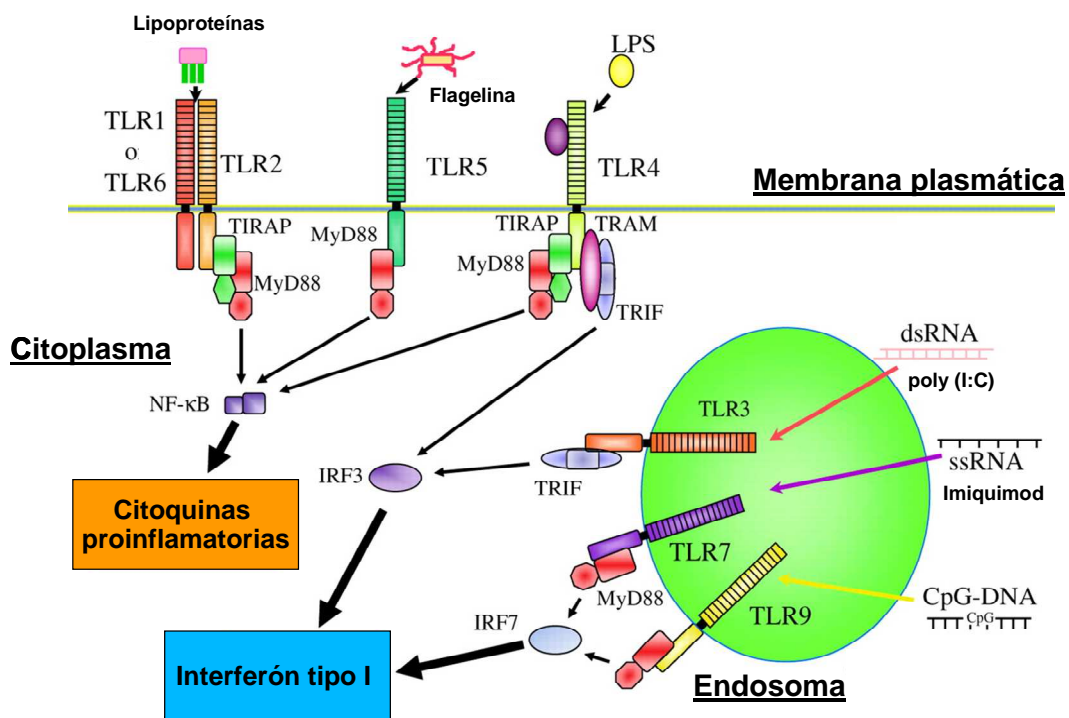


Figura I1. Esquema de las vías de señalización de los TLR. Adaptado de Akira 2011.

La unión de un ligando de TLR a su receptor da lugar a una rápida activación de la respuesta inmunitaria al inducir la maduración de las CD, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias y la sobreexpresión de moléculas de co-estímulo (Aderem *et al.* 2000; Kaisho *et al.* 2002; Werling *et al.* 2003), e incluso la diferenciación de las células T memoria (Pasare *et al.* 2004; Salem *et al.* 2005). Por otro lado, los TLR juegan un papel importante en el desarrollo de varias enfermedades, incluyendo enfermedades inflamatorias y

shock séptico. Por este motivo, recientemente las vías de señalización originadas en estos receptores se han considerado como dianas para el tratamiento de enfermedades infecciosas y desórdenes inflamatorios (O'Neill *et al.* 2007).

Con este propósito, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para comprender los fenómenos involucrados en las respuestas inmunitarias que inducen estos receptores. Así, entre otros se han demostrado los efectos inmunopotenciadores del Pam(3)Cys-SK4 (PCSK, ligando de TLR2) (Cario *et al.* 2007), del ácido poliinosínico: policitidílico (poly (I:C), ligando de TLR3) (Salem *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006), del lipopolisacárido (LPS, ligando de TLR4) (Yokoi *et al.* 2009), de la flagelina (TLR5) (Bargieri *et al.* 2008), del Imiquimod (TLR7) (Othoro *et al.* 2009) o de los CpGs (regiones de DNA viral o bacteriano, ligandos de TLR9, en las que existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) (Kline *et al.* 2008).

2.1.2. Células Dendríticas

Las CD son las principales células presentadoras de antígeno (**CPA**) del organismo (Banchereau *et al.* 1998; Banchereau *et al.* 2000) y desempeñan un papel esencial en la iniciación, programación y regulación de las respuestas inmunológicas antígeno-específicas. Establecen un puente entre la respuesta inmunitaria innata y la respuesta adaptativa.

Podemos diferenciar dos grandes tipos de CD de acuerdo a sus características fenotípicas y funcionales: CD mieloides (**mCD**) o convencionales y CD plasmacitoides (**pCD**). Las mCD provienen de la línea mieloides y son las células más importantes en la presentación antigénica. Las mCD se dirigen a los tejidos periféricos, donde interceptan y capturan los patógenos, antes de su migración a los ganglios linfáticos para activar la respuesta T (Belmonte *et al.* 2007). Se caracterizan por su capacidad para producir citoquinas como IL-12 y TNF- α , entre otras. Se diferencian en dos subtipos según la expresión de CD11c y CD141. La población homóloga de esta última en ratón se caracteriza por co-expresar CD11c y CD8 $\alpha\alpha$ (Shortman *et al.* 2010). La segunda subpoblación, las pCD, es de origen linfoide y se distingue

de las mCD por expresar en su superficie el antígeno CD303. Ejercen su actividad principalmente en la respuesta antiviral, con una gran capacidad para producir IFN de tipo I en respuesta a virus (Siegal *et al.* 1999; Liu 2005).

2.1.2.1. Activación-maduración de las células dendríticas

Las CD intensifican la presentación antigénica cuando se induce sobre ellas un programa de expresión génica que se conoce como maduración o activación. Los cambios que definen el fenotipo de las CD maduras son: (i) pérdida de la intensa capacidad fagocítica que tienen las CD en estado inmaduro; (ii) cambios en el patrón de receptores de quimioquinas expresados en la membrana, con la finalidad de orientar su migración a órganos linfoides secundarios y presentar allí el antígeno a los linfocitos T (Alvarez *et al.* 2008); (iii) incremento de expresión en la superficie celular de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II; (iv) aumento en la expresión de moléculas de co-estímulo como CD80, CD86 y CD40; (v) producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-15 e IFN- γ , entre otros mediadores proinflamatorios (Banchereau *et al.* 2000). Este programa de maduración se pone en respuesta a estímulos como: (i) el reconocimiento de los PAMPs a través de los TLRs (Takeda *et al.* 2003); (ii) citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IFN- α , entre otras); (iii) interacción con linfocitos T colaboradores activados, mediada por la interacción CD40-CD40L (Lanzavecchia 1998). Estas señales de activación y maduración se transmiten al interior de las CD generalmente a través de vías de señalización intracelular mediadas por miembros de la familia NF- κ B, pero dependiendo del estímulo de maduración, también contribuyen de un modo esencial las rutas de las proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK).

Los mecanismos que regulan la maduración y los movimientos migratorios de las CD en los tejidos dependen fundamentalmente del microambiente que rodea a estas células (Yang *et al.* 2004).

2.1.3. Células NK

Las células NK son células de la inmunidad innata que se han identificado como una subpoblación de linfocitos con fenotipo CD3⁻ y carentes de receptores de antígenos de distribución clonal como los receptores de Ig o los receptores de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*). Representan entre el 10 - 20% de las células mononucleares de sangre periférica y tienen la capacidad de producir diferentes citoquinas y de lisar células infectadas por virus y células tumorales que tienen una expresión reducida de moléculas de MHC-I. La mayoría están localizadas en la sangre periférica, nódulos linfoides, bazo y médula ósea (Ferlazzo *et al.* 2004), pero pueden migrar hacia focos de inflamación por diferentes quimioatrayentes (Maghazachi 2010).

Las células NK expresan en su superficie receptores que se clasifican en inhibidores y activadores. Del balance de las señales de estos receptores dependerá la activación de las células NK. Los principales grupos de **receptores inhibidores** son el receptor KIR (del inglés *Killer Ig-like receptor*) (Bottino *et al.* 2004), que se une al HLA de clase I, y el heterodímero compuesto de las lectinas tipo C NKG2A/B, que se une de forma covalente a CD94 reconociendo al HLA-E (Braud *et al.* 1998). La falta de un simple alelo de MHC-I sensibiliza las células NK debido a la ausencia de señales inhibitoras. De este modo, los receptores de activación promueven a la célula NK a destruir a la célula infectada o tumoral.

Dentro de los **receptores activadores** existen algunos que interactúan con ligandos solubles, como las citoquinas, y otros que interactúan con las células mediante moléculas de superficie. Las citoquinas IL-15, IL-12 e IL-18, producidas por las CD, son requeridas para la maduración y supervivencia de las células NK (Zitvogel *et al.* 2006; Lucas *et al.* 2007) o macrófagos (Mortier *et al.* 2009). De este modo, responden secretando IFN- γ que a su vez estimula a las CD y macrófagos para eliminar los microorganismos fagocitados (Guia *et al.* 2008). También pueden producir otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α e inmunosupresoras, como IL-10 (Vivier *et al.* 2011). Entre los receptores de superficie activadores de las células NK nos encontramos con el receptor FcR3a (CD16) que puede reconocer dianas recubiertas de anticuerpos dando

lugar al proceso denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Otro grupo son los denominados receptores de citotoxicidad naturales NKp46, NKp44 y NKp30, que contienen las estructuras de activación ricas en inmunorreceptores tirosina (ITAM), como las proteínas CD3 ζ , Fc ϵ R1 γ y DAP12 (Moretta *et al.* 2001).

El proceso clave de la citotoxicidad es la secreción de gránulos que contienen una proteína denominada perforina, que crea poros en las membranas de las células diana, y enzimas conocidas como granzimas que entran a través de los poros e inducen la apoptosis. Este mecanismo de la citólisis es equivalente al de los linfocitos T citotóxicos.

2.2. Inmunidad adaptativa

A diferencia de la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa que se activan específicamente y cuya intensidad-capacidad defensiva aumenta después de una segunda exposición al patógeno.

Los componentes efectores de la inmunidad adaptativa son los linfocitos B y T. Los linfocitos B (**LB**) son los encargados de la respuesta humoral y poseen inmunoglobulinas (Ig) de membrana que actúan como receptor antigénico que reconocen a los antígenos nativos de diferente composición química. Tras el reconocimiento del antígeno se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos de la misma especificidad que el receptor antigénico, que se unirán específicamente al patógeno. Por su parte, los linfocitos T (**LT**) se encargan de la respuesta celular y reconocen antígenos proteicos a través del **TCR**. En este caso, los antígenos reconocidos precisan de un procesamiento previo hasta el tamaño de péptidos, para posteriormente asociarse a moléculas de MHC. Dentro de esta población celular encontramos varias subpoblaciones, entre las que destacan las células CD4 o cooperadoras y las CD8 o citotóxicas.

2.2.1. Linfocitos T helper

Los linfocitos T cooperadores o helper (**LTh**) desempeñan un papel importante no sólo en la inducción sino también en el mantenimiento y

regulación de las respuestas inmunitarias, ayudando a determinar qué tipo de respuesta presentará el organismo ante un patógeno concreto (Abbas *et al.* 1996; McHeyzer-Williams *et al.* 2003).

Los LTh se activan cuando reconocen, a través de su TCR, fragmentos peptídicos de 8 a 23 aminoácidos (llamados determinantes Th; **DTh**) unidos a moléculas de MHC de clase II. Su función depende tanto del reconocimiento específico del antígeno en el contexto del MHC de clase II presentado en la superficie de las CPA, como de la expresión en su membrana de moléculas co-estimuladoras, promoviendo así su expansión, la secreción de citoquinas y a su vez la diferenciación hacia células Th1 o Th2. Los **linfocitos Th1** (Cherwinski *et al.* 1987; Mosmann *et al.* 1989) secretan principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2, y están asociados a respuestas inmunitarias mediadas por células, como linfocitos T citotóxicos, macrófagos y neutrófilos. Los **linfocitos Th2** (Cherwinski *et al.* 1987; Stevens *et al.* 1988) producen fundamentalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, destinadas a ayudar a los LB en la producción de anticuerpos y a la activación de eosinófilos. Con posterioridad se identificó un tercer fenotipo, conocido como **Th0** (Firestein *et al.* 1989; Katsikis *et al.* 1995), capaz de producir ambos perfiles/tipos de citoquinas. Sin embargo, se discute la existencia de esta población Th0, o si más bien es una mezcla de LTh1/LTh2.

Existe además una subpoblación de LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, las células T reguladoras (**Treg**), que presentan funciones inmunosupresoras o reguladoras de la respuesta inmunitaria y que juegan un papel fundamental en los procesos de tolerancia periférica (Sakaguchi 2004; Maloy *et al.* 2005). A pesar de que aún no están totalmente claros sus mecanismos de acción (Blauvelt 2008; Oukka 2008), la mayoría de los estudios en humanos y en ratones concluyen que las Treg llevan a cabo su efecto supresor mediante un mecanismo dependiente del contacto directo célula-célula aún desconocido (Nakamura *et al.* 2001), pero dependiente de TGF- β e IL-10 (Nakamura *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005). Para que una célula Th *naïve* se diferencie a Treg, es necesaria la presencia de TGF- β en su entorno. Si en este ambiente también están presentes IL-6 e IL-23, se genera una población celular recientemente

descubierta, **Th17**. Esta población se caracteriza principalmente por producir IL-17 y su función principal es la eliminación de patógenos extracelulares durante las infecciones, promoviendo la inflamación y estando implicada en patologías de enfermedades autoinmunes (Weaver *et al.* 2007).

2.2.2. Linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T citotóxicos (**LTc**) se encargan de destruir las células infectadas por virus y otros patógenos, así como las que están dañadas o alteradas por otras causas como las células tumorales (Zinkernagel *et al.* 1977; Pardoll 1993; Harty *et al.* 2000).

Cada LTc reconoce específicamente un antígeno diferente que consiste en un fragmento peptídico de entre 8 y 12 aminoácidos (McMichael 1979; McMichael 1980) denominado determinante T citotóxico (**DTc**) presentado en la superficie celular por las moléculas MHC de clase I. Cuando el LTc toma contacto con tales células, se inicia un proceso que finalmente desemboca en la muerte de la célula diana. En este proceso se produce la lisis celular mediante la exocitosis de gránulos que contienen principalmente perforinas y granzimas e inducen la apoptosis de la célula diana a través de la mediación de moléculas inductoras de muerte celular como Fas y su ligando.

El LTc, al activarse, también secreta citoquinas, como IFN- γ , TNF- α o IL-2, que contribuyen a la defensa frente al patógeno. Esta activación tiene unos controles muy estrictos y, por lo general, requiere una señal de activación muy fuerte por parte del complejo MHC-I/DTc y señales adicionales proporcionadas por los LTh (Freeman *et al.* 1993; Linsley *et al.* 1993; Bourgeois *et al.* 2002). Sin embargo, no siempre la ayuda CD4 es indispensable, existiendo varios modelos de activación de LT CD8 en donde las células CD4 no participan (Lasarte *et al.* 1995; Bachmann *et al.* 1998).

Tras la activación de los LT, algunos de ellos se convierten en **linfocitos memoria**, que tienen un largo periodo de vida y son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria rápida y potente si se produce una nueva infección por ese mismo patógeno (Ahmed *et al.* 1996). Para la generación de los LT CD8 memoria en respuestas inmunitarias contra virus y bacterias (Shedlock *et*

al. 2003) así como en la erradicación de tumores (Marzo *et al.* 2000), se requieren los LT CD4 ya que, aunque los LT CD8 memoria podrían generarse en su ausencia, son menos eficaces que los generados con su ayuda (Janssen *et al.* 2003; Shedlock *et al.* 2003). La población de los LT memoria se regula mediante mecanismos homeostáticos para mantener a lo largo del tiempo una representación de la misma. Fundamentalmente, dos citoquinas son las responsables de la homeostasis de esta población celular: IL-7, que es esencial para su supervivencia, e IL-15, que se encarga principalmente de su proliferación para mantener una población mínima de reserva (Surh *et al.* 2008).

2.2.3. Células NKT

Las células NKT se definen como una población especializada de células T que expresan TCR $\alpha\beta$ junto a algunos receptores propios del linaje de las células NK (Bendelac *et al.* 1997). Esta población celular está formada principalmente por células doble negativas $CD4^- CD8^-$ y células $CD4^+$ (MacDonald 1995) que expresan un repertorio restringido de la cadena α del TCR formado por la cadena invariante $V\alpha 14J\alpha 18$ (Lantz *et al.* 1994) asociado con las cadenas β del TCR ($V\beta 8.2$, $V\beta 7$ y $V\beta 2$ en ratones, $V\beta 11$ en humanos) (Godfrey *et al.* 2007).

Las células NKT proporcionan un puente de unión entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativa. Son capaces de reconocer moléculas tales como α -galactosilceramidas (α -GalCer) presentadas en el contexto de CD1d, (Kawano *et al.* 1997; Burdin *et al.* 1998) y glicosilfosfatidilinositoles (Schofield *et al.* 1999). Las células NKT están presentes en la mayoría de tejidos donde se encuentran las células T, en particular en el hígado, médula ósea, bazo y timo (Bendelac *et al.* 1994; Ohteki *et al.* 1994; Yoshimoto *et al.* 1995). Son capaces de secretar rápidamente una gran cantidad de citoquinas Th1 y Th2 (Zlotnik *et al.* 1992; Arase *et al.* 1993; Bendelac *et al.* 1997), aunque también pueden actuar directamente ya que expresan perforinas y moléculas de superficie como FasL (Arase *et al.* 1994; Dao *et al.* 1998). Esto indica que también están

implicadas en la activación de las CD y en la respuesta adaptativa, que son capaces de dirigir (Singh *et al.* 1999).

3. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

3.1. Procesamiento antigénico

En los tejidos periféricos, las CPA capturan antígenos propios y ajenos que son procesados y presentados en su superficie en forma de péptidos cortos unidos a las moléculas MHC, para poder ser reconocidos por los LT (Mellman 2005). Dependiendo del tipo de antígeno, tendrá un procesamiento diferente y será presentado en las moléculas MHC de clase I o II (Jensen 2007; Villadangos *et al.* 2007).

Los **antígenos endógenos**, como proteínas propias, proteínas intracelulares derivadas de un patógeno que ha infectado la célula (virus, bacterias, protozoos), o proteínas inducidas durante el desarrollo de un tumor, se degradan en el citoplasma de la CPA por un complejo enzimático multiprotéico llamado proteasoma. Algunos de los fragmentos peptídicos generados (DTc), son transportados mediante un transportador dependiente de ATP llamado TAP (del inglés *Transporter associated protein*) desde el citoplasma hasta el retículo endoplasmático, donde se unen a las moléculas **MHC de clase I**. El complejo MHC-I/DTc pasa a través del aparato de Golgi antes de llegar a la superficie celular, donde será presentado a los LTc (**Figura I2**).

Los **antígenos exógenos** son captados e internalizados en endosomas por CPA especializadas, y se procesan a través de la ruta endocítica. Estos antígenos se degradan mediante enzimas proteolíticas que actúan a pH ácido en el interior de vesículas endocíticas, donde se unen con las moléculas **MHC de clase II**. Finalmente, el complejo MHC-II/DTh es transportado a la superficie celular para ser presentado a los LTh. Este complejo forma una unión estable que puede permanecer varios días (**Figura I2**).

Existen antígenos pertenecientes a microorganismos que no infectan a las CPA o que se expresan en tumores de poblaciones celulares diferentes a las CPA. Para que se produzca la presentación en MHC-I de dichos antígenos, se ha postulado una vía alternativa: la presentación cruzada (**cross-presentation**) (**Figura I2**), en la que los antígenos de la vía exógena pasan a la vía endógena. Se cree que dichos microorganismos, células o componentes celulares son capturados por CPA profesionales y procesadas mediante mecanismos que pueden ser tanto dependientes como independientes del proteasoma. De este modo, los antígenos son presentados a través del MHC-I de una CPA al LTC (Gil-Torregosa *et al.* 1998; Rock *et al.* 2005).

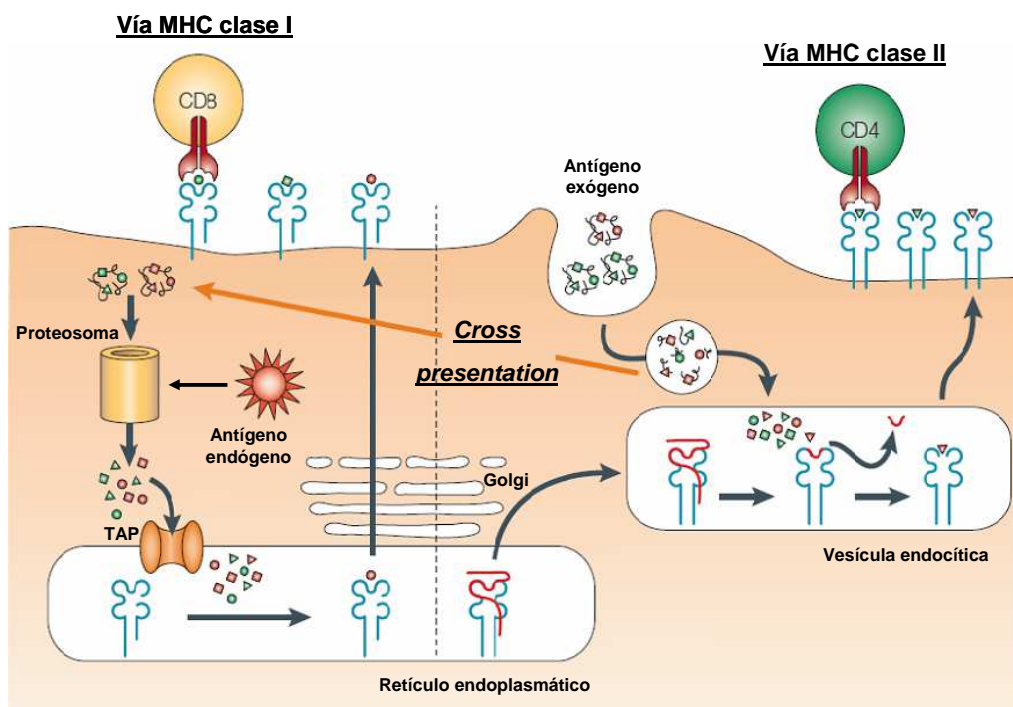


Figura I2. Procesamiento antigénico mediante la vía MHC de clase I y II. Adaptado de Heath *et al.* 2001.

3.2. Reconocimiento y activación

El reconocimiento de un DT por parte de un LT (**señal 1**) junto con las señales correspondientes a las moléculas de co-estímulo (**señal 2**) y las citoquinas (**señal 3**) dan lugar a la activación del LT. En el caso de los LTh, su activación conlleva un aumento en los niveles de expresión del ligando de

CD40 en la superficie. Este ligando interactúa con la molécula CD40 presente en la superficie de las CD, promoviendo su activación (Grewal *et al.* 1996). Estas interacciones inducen un aumento de la expresión de MHC y de moléculas de adhesión y co-estímulo (CD40, ICAM (CD54), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)) en la superficie de las CD, así como la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α) (Cella *et al.* 1996; Koch *et al.* 1996; Stout *et al.* 1996). Tras la activación, los LT van a migrar desde los nódulos linfoides a través de la circulación sanguínea hasta donde se encuentre el antígeno para eliminarlo.

Mientras suceden todos estos procesos, las células del sistema innato (células fagocíticas, células citotóxicas NK) y proteínas como el sistema del complemento, están eliminando el antígeno. Además, se producen una serie de citoquinas y quimioquinas que van a atraer a los LT (que se encuentran en el torrente circulatorio) hacia las zonas de inflamación.

Las células tumorales o las células infectadas por un virus, presentan en su superficie fragmentos peptídicos provenientes de las proteínas tumorales o de patógenos, unidos al MHC-I, que serán reconocidos por los LTc a través de su TCR. Tras el reconocimiento, y con ayuda de los LTh1, los LTc van a producir citoquinas y a lisar las células diana, en lo que se denomina **fase efectora de eliminación del antígeno**.

Una vez que los linfocitos han realizado su función, comienza la **fase de la homeostasis**, en la que la mayoría de ellos mueren por apoptosis. Sin embargo, algunos se diferencian en linfocitos memoria, que sobreviven durante períodos prolongados en un estado de reposo y son los responsables de que la respuesta inmunitaria sea más intensa y rápida tras una nueva exposición al mismo antígeno. Hay que destacar que los mismos mecanismos que activan una respuesta T efectora, también ponen en marcha los dispositivos de freno y control de la respuesta inmunitaria. Dentro de estos mecanismos inmunosupresores de control se encuentran citoquinas (TGF- β , IL-10), moléculas de membrana como CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PD-1 (del inglés *Programmed Death-1*) o el factor de transcripción

FoxP3, siendo esta capacidad de autorregulación del sistema inmunitario fundamental para el organismo.

4. INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

Entendemos por **cáncer, tumores malignos o neoplasias malignas**, al término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se caracterizan por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como **metástasis**, siendo ésta la principal causa de muerte por cáncer. Según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud al cáncer se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total de las ocurridas en todo el mundo).

A finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX la investigación en el cáncer marcó un antes y un después, estableciéndose los principios básicos de la biología del cáncer que hoy conocemos (Weinstein *et al.* 2008). En 1909, Paul Ehrlich predijo que el cáncer sería algo común en todos los organismos de larga vida si no fuera por el control inmunitario. Los avances sobre el entendimiento del sistema inmunitario combinado con la demostración de la existencia de antígenos tumorales (Old *et al.* 1964), permitieron que 50 años después de la idea sobre el “control inmune en el cáncer”, Burnet y Thomas, postularan la hipótesis de la **inmunovigilancia** frente al cáncer. Establecieron que el sistema inmunitario era capaz de reconocer y eliminar células tumorales antes de que crezcan y se establezca el cáncer, así como de eliminar tumores ya formados. La posibilidad de que respuestas inmunitarias específicas puedan erradicar los tumores, ha motivado a lo largo de los años un debate sobre esta hipótesis en el campo de la inmunología tumoral. Sin embargo, el desarrollo de ratones transgénicos, y la capacidad para producir anticuerpos monoclonales específicos de determinados componentes del sistema inmunitario, ha permitido demostrar la hipótesis de la inmunovigilancia en el cáncer en modelos murinos inmunodeficientes (Smyth *et al.* 2001; Dunn *et al.* 2002; Dunn *et al.* 2004a; Dunn *et al.* 2004b; Schreiber *et al.* 2011).

4.1. Microambiente tumoral

Los tumores son estructuras complejas que contienen muchos tipos diferentes de células. Durante muchos años los científicos centraron sus investigaciones en entender la transformación de células normales a células neoplásicas, pero dedicaban muy poco tiempo a estudiar otros tipos celulares también presentes en los tumores. Sin embargo, con la investigación reciente, se ha puesto de manifiesto que otros componentes de los tumores, incluyendo células residentes no cancerosas (fibroblastos, células endoteliales, células del sistema inmunitario), tejido conectivo y matriz extracelular (componentes de tejidos que proveen soporte estructural, como por ejemplo el colágeno) son de igual importancia en la iniciación y progresión tumoral. En conjunto, estos componentes son conocidos como el estroma, aunque muchos investigadores prefieren un término más amplio, **microambiente tumoral**, ya que abarca células infiltrantes del sistema inmunitario (macrófagos, linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)) y moléculas libres de células (citoquinas, proteasas), además de los componentes más o menos permanentes del estroma (Witz 2006; Cretu *et al.* 2007) (**Figura I3**).

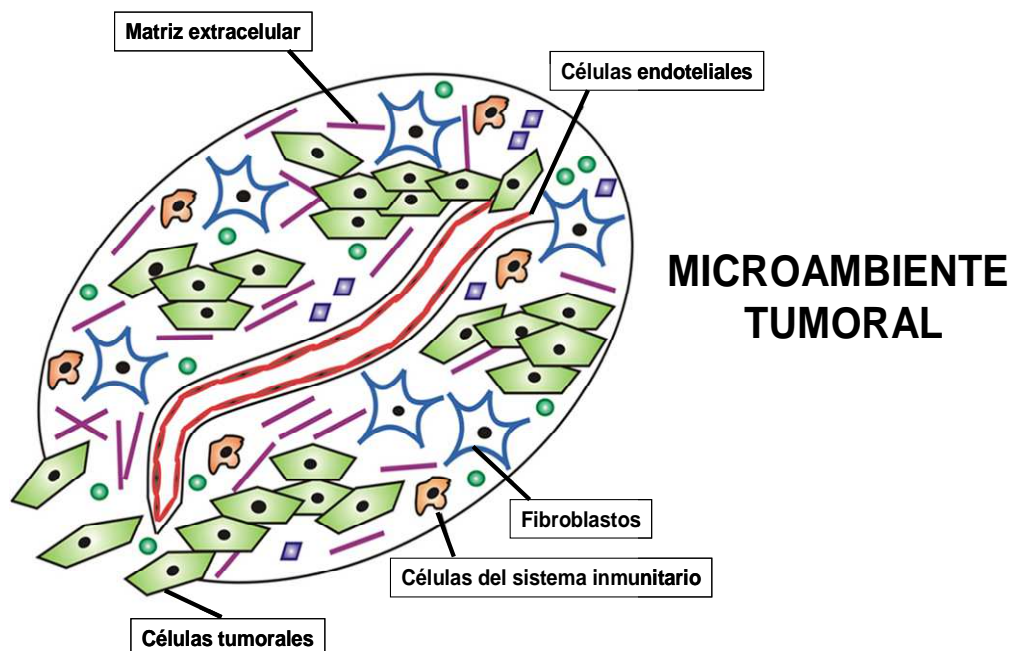


Figura I3. Componentes principales del microambiente tumoral. Adaptado de Nyberg *et al.* 2008.

En un gran número de tumores, la presencia en el mismo de TILs se usa como marcador pronóstico, como en el caso del melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de colon y cáncer de cuello (Liako *et al.* 2007; Uppaluri *et al.* 2008; Oble *et al.* 2009). *Ex vivo*, la depleción de las células Treg de la población TIL incrementa la lisis de las células tumorales por las NK (Ghiringhelli *et al.* 2005a). De la misma forma, la respuesta de los TIL puede recuperarse *ex vivo* mediante la inhibición de arginasa-1 y óxido nítrico (NOS2), mecanismos inmunosupresores producidos por el tumor. De esta forma, se puede comprobar que la comunicación entre los diferentes componentes de un tumor y sus alrededores es un factor importante. Tanto interacciones pro-tumorales así como anti-tumorales ocurren para mejorar o bloquear la formación y progresión del tumor.

Además, la composición real del microambiente tumoral es altamente variable, difiriendo entre pacientes e incluso entre distintas áreas del mismo tumor. El microambiente tumoral es a menudo alterado mientras la enfermedad progresa, incluso el porcentaje de un tumor conformado por células cancerosas puede cambiar (Zalatnai *et al.* 2006), siendo un proceso altamente dinámico.

4.2. Inmunoedición del cáncer

El sistema inmunitario puede reconocer y eliminar las células tumorales, sin embargo, estas células pueden evadir al sistema inmunitario para así favorecer su crecimiento. La teoría de la inmunoedición explica el reconocimiento del tumor por el sistema inmunitario, donde se distinguen tres fases principalmente (Dunn *et al.* 2002) (**Figura I4**).

- **Eliminación:** La activación coordinada y equilibrada entre el sistema inmunitario innato y adaptativo es fundamental para la inmunovigilancia frente al desarrollo de tumores. El mecanismo por el cual el sistema inmunitario es alertado de la presencia de células tumorales no está del todo claro. Una de las posibilidades son las señales de peligro descritas por la Dra. Matzinger, que inducen señales inflamatorias reclutando células del sistema inmunitario

(Matzinger 1994). Si la célula tumoral se destruye, la inmunovigilancia habrá cumplido con su función, la **protección** frente al desarrollo del tumor.

- **Equilibrio:** Si el proceso de la eliminación no se desarrolla adecuadamente, las células del tumor pueden entrar en la fase de equilibrio donde las células tumorales se mantienen o son “esculpidas inmunológicamente” para producir nuevas variantes tumorales. Algunos modelos experimentales demuestran que la inmunidad adaptativa es la responsable de mantener las células tumorales en un estado quiescente, mientras que la inmunidad innata no ejerce ninguna función en esta fase (Schreiber *et al.* 2011).

- **Escape:** Cuando el sistema inmunitario no consigue eliminar todas las células del tumor, los tumores con baja inmunogenicidad pueden ser capaces de escapar al reconocimiento inmune y su eliminación (Svane *et al.* 1996; Smyth *et al.* 2000; Shankaran *et al.* 2001; Takeda *et al.* 2002). Estas células tumorales (carentes en expresión de antígeno y/o MHC-I) continúan creciendo y se expanden de una manera incontrolada, conduciendo a tumores malignos y progresión del cáncer que puede ser clínicamente detectable. En esta fase los mecanismos inmunosupresores que se inducen en el microambiente tumoral son determinantes para el escape inmunológico.

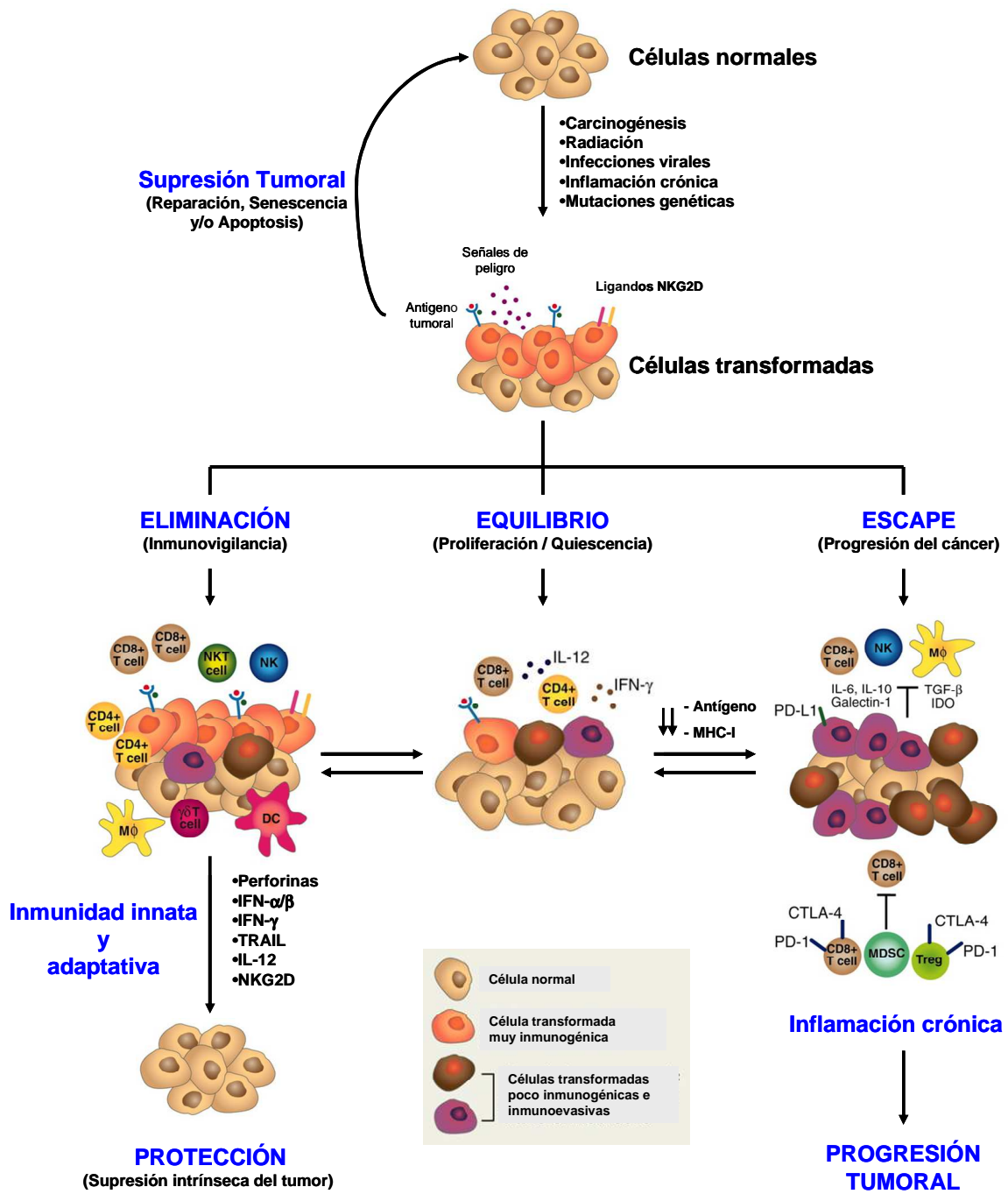


Figura I4. Inmunoección del cáncer. Adaptado de Schreiber *et al.* 2011.

Durante estas fases, las células tumorales interactúan con su ambiente tolerogénico y son influidas por señales que provienen del estroma, del endotelio vascular y del sistema inmunitario. En este contexto, a los tumores sólidos se les ha asociado con la producción de factores relacionados con la **inflamación**. La inflamación se trata de un proceso fisiológico amplio y complejo que mantiene la homeostasis tisular en respuesta a factores de estrés tales como el daño tisular o las infecciones. Comienza con una cascada de mecanismos bioquímicos, que producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos, que atraen y activan a los leucocitos de la sangre periférica para hacer frente a los agentes patogénicos en el foco de inflamación. La resolución del proceso inflamatorio comprende la cicatrización de heridas, reparación de tejidos y por lo tanto la limpieza de las células muertas y restos celulares. De este modo, en condiciones fisiológicas, se trata de un proceso autolimitado y controlado. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria inicial persiste o falla en la resolución, la inflamación aguda dará lugar a una **inflamación crónica**. Los patólogos han reconocido desde hace tiempo que en la mayoría de las infecciones crónicas se infiltran, en una mayor o menor medida, células del sistema inmunitario innato y adaptativo. Aunque el infiltrado leucocitario está correlacionado con un intento de eliminar la infección, hoy en día se ha demostrado que las propias células del sistema inmunitario pueden tener efectos promotores sobre el desarrollo de tumores (Blotnick *et al.* 1994; Curiel *et al.* 2004). Existen ejemplos donde se muestra una fuerte correlación, como es el caso de la infección por los virus de la hepatitis B o C y cáncer de hígado (Szmuness 1978), el virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino (Frazer 2004), o *Helicobacter pylori* y el cáncer de estómago (Pritchard *et al.* 2006). Estos acontecimientos evidencian que la infección y, por lo tanto, la inflamación, pueden progresar a una fase crónica que facilita la oncogénesis (Coussens *et al.* 2002).

4.3. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria

Durante la progresión tumoral se generan múltiples mecanismos inmunosupresores que conducen a la evasión del reconocimiento inmune o a la desactivación de los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Dichos

mecanismos incluyen alteraciones en la presentación antigénica, defectos en señales intracelulares de los LT, incremento de la secreción de factores inmunosupresores y/o pro-apoptóticos, activación de vías de señalización inhibitorias en células del sistema inmunitario y reclutamiento selectivo de poblaciones reguladoras (Rabinovich *et al.* 2007).

4.3.1. Baja inmunogenicidad

4.3.1.1. Ausencia o modulación de la expresión de antígenos tumorales

La pérdida de expresión de antígenos tumorales es uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria mediada por los LTc. Como ejemplo, la disminución de la expresión de antígenos de diferenciación melanoma-melanocito, tales como gp-100, antígenos reconocidos por células T como MART1 y TRP, están asociados con la progresión de la enfermedad (de Vries *et al.* 1998). El mecanismo responsable de la disminución de la expresión de los antígenos tumorales es, en la mayoría de los casos, desconocido. Sin embargo, parece que podría ser facilitado por la presencia de antígenos inmunodominantes (Schreiber *et al.* 2002). El fenómeno de inmunodominancia podría deberse a la detección de determinados epítomos frente a otros que también se expresan en la superficie de la célula diana. Esta teoría postula que las variantes tumorales en combinación con la pérdida antigénica son capaces de evadir la respuesta inmunitaria porque las células tumorales parentales que poseen el antígeno inmunodominante sirven como diana para el ataque inmunitario, consiguiendo así desviar la atención de las variantes tumorales.

4.3.1.2. Ausencia de MHC-I

La disminución de la expresión de las moléculas de MHC-I ha sido demostrada en una gran variedad de tumores (Ferrone *et al.* 1995; Cabrera *et al.* 1996; Cabrera *et al.* 1998; Marincola *et al.* 2000). En muchos casos, se producen pérdidas selectivas de alelos HLA (del inglés *human leukocyte antigens*) lo que parece producir una disminución en la capacidad de presentación de un antígeno inmunodominante del tumor. El mecanismo más

común para la pérdida total de las moléculas de MHC-I son las mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina (D'Urso *et al.* 1991; Wang *et al.* 1993; Benitez *et al.* 1998). También se ha demostrado la disminución de los niveles de expresión de los genes TAP así como de los componentes del proteasoma en una gran variedad de tumores (Hilders *et al.* 1994; Rowe *et al.* 1995; Sanda *et al.* 1995; Alpan *et al.* 1996; Seliger *et al.* 1996). En la mayoría de los casos donde se produce una disminución de la actividad de la maquinaria de procesamiento antigénico, la expresión se recupera tras el tratamiento con IFN- γ (Hallermalm *et al.* 2008), lo que sugiere que esta disminución de la expresión se debe a un fenómeno epigenético reversible.

4.3.1.3. Ausencia de moléculas co-estimuladoras y presencia de moléculas inhibidoras de membrana

Para que el LT prolifere e inicie sus funciones efectoras es necesario el reconocimiento del antígeno y de las moléculas co-estimuladoras y de adhesión. La falta de moléculas co-estimuladoras en las células tumorales puede inducir fenómenos de anergia de los LT *naïve* (no producen citoquinas, no proliferan) o que experimenten apoptosis. También se han descrito moléculas que transmiten señales inhibidoras al interior del LT como CTLA-4, que comparte ligandos con su homólogo estructural CD28 y recientemente se ha observado que es capaz de secuestrar transcelularmente a CD80 y CD86 expresados por las CD (Qureshi *et al.* 2011). Además, en las células tumorales se sobreexpresan diversas moléculas, como B7-H1 (PD-L1), que al fijarse a su receptor PD-1 de los LT activados puede inhibir la función efectora de éstos. Esta ausencia de señales co-estimuladoras o aumento de señales inhibidoras disminuyen los efectos antitumorales de los LT.

4.3.2. Factores inmunosupresores

En el contexto del tumor existen diferentes factores inmunosupresores. Entre ellos se encuentran poblaciones celulares con carácter inmunosupresor, que actúan directamente por contacto, a través de la producción de factores solubles como las citoquinas o mediante la activación de enzimas que generan metabolitos inmunosupresores. Las propias células del sistema inmunitario,

enzimas, citoquinas y otras moléculas producidos tanto por las células tumorales como por las células del estroma y del infiltrado linfocitario, componen los factores de inmunosupresión en el microambiente tumoral. La expresión de galectina-1 (Rabinovich *et al.* 2001), ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Totzke *et al.* 2003), arginasa-1 (Bronte *et al.* 2005), NOS2 (Eyler *et al.* 2011), TGF- β (Derynck *et al.* 2001), VEGF (Karnezis *et al.* 2012), IL-6 (Schafer *et al.* 2007) o IL-10 (Vicari *et al.* 2004), han sido identificados y estudiados, como responsables de la evasión tumoral al reconocimiento por el sistema inmunitario.

4.3.2.1. Células inmunosupresoras

Los factores de crecimiento inmunosupresores y las citoquinas presentes en el microambiente del tumor promueven la diferenciación, la expansión y el reclutamiento de varias poblaciones de células como los Treg, células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSC), macrófagos asociados al tumor (TAM) y distintos subtipos de CD maduras e inmaduras. La identificación de la amplia gama de células regulatorias es crucial para lograr comprender los mecanismos de inmunosupresión que impiden el desarrollo de una respuesta antitumoral y obstaculizan el éxito de las estrategias de inmunoterapia (**Figura I4**).

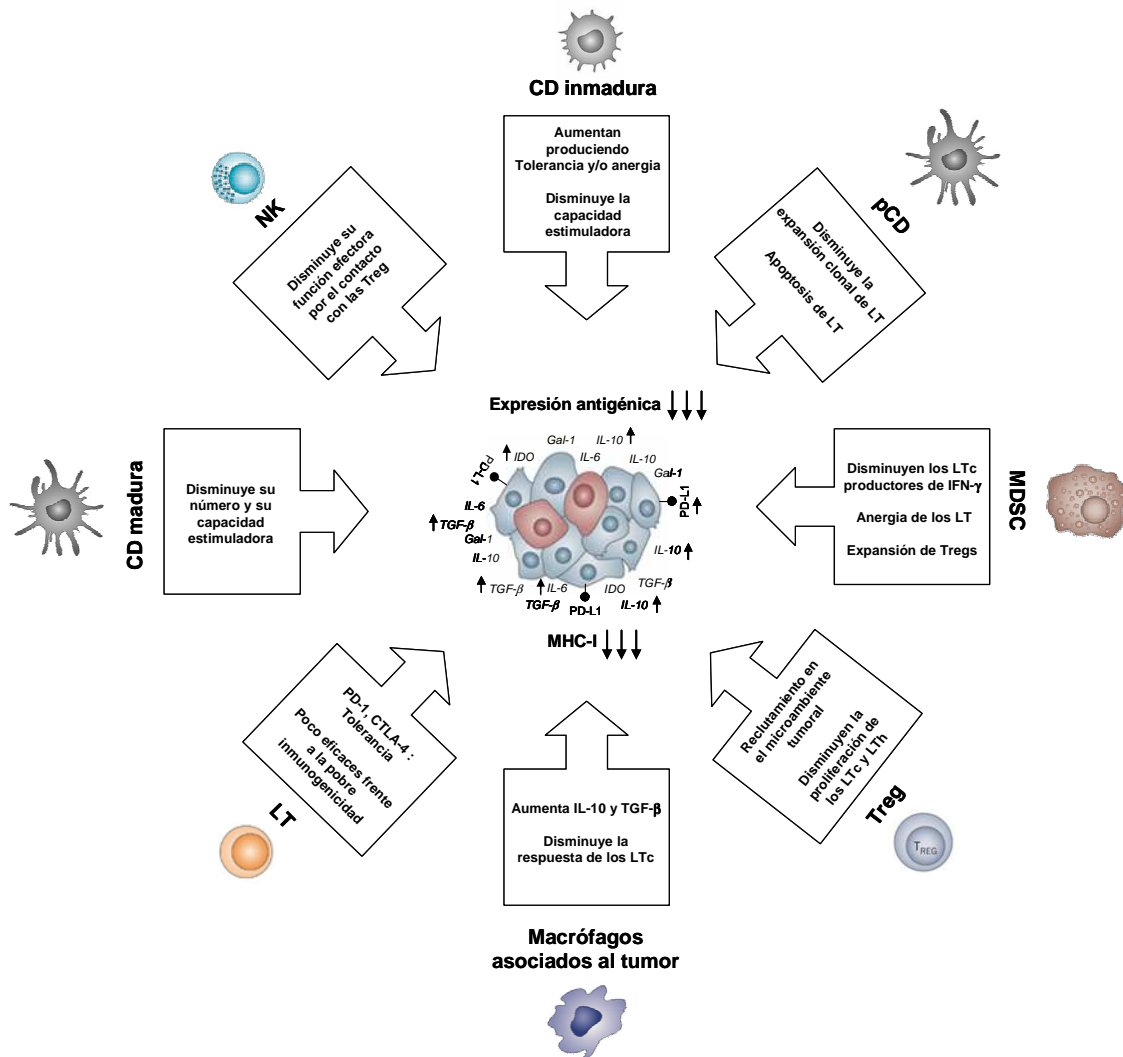


Figura I4. Interacción de las células del sistema inmunitario con el microambiente tumoral.

4.3.2.1.a. Linfocitos T reguladores

Los Treg fueron identificados como un subtipo de LT CD4⁺ que constitutivamente expresan la molécula CD25 y suprimen respuestas de LT efectores (CD4⁺ y CD8⁺) (Sakaguchi 2004). Durante los últimos años los Treg están adquiriendo un gran interés tanto en la inmunidad tumoral como infecciosa (von Boehmer 2005). Este interés se remonta a las investigaciones de Sakaguchi *et al.*, que demostraron que los Treg podían prevenir el desarrollo de una respuesta autoinmune en timentomias neonatales (Sakaguchi *et al.*

1995). Posteriormente se confirmó su potencial regulador en enfermedades autoinmunes, infecciosas y modelos tumorales (Shevach 2004). Se ha sugerido que el factor de transcripción forkhead box P3 (FoxP3) representa un marcador intracelular altamente específico de estas células, sobre todo cuando está co-expresado con otros marcadores como CTLA-4, GITR, LAG-3 y neuropilina (Beissert *et al.* 2006). Con respecto a su papel en el desarrollo de tumores, existen numerosos trabajos que muestran que las células CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ se encuentran incrementadas en pacientes con tumores de pulmón, páncreas, mama, ovario y piel, tanto en circulación como en infiltrados peri e intratumorales (Curiel *et al.* 2004). Los Treg inhiben la respuesta antitumoral a través de diversos mecanismos, como el bloqueo de la activación de LTc y LTh (Zou 2006), la inhibición de la actividad citotóxica y la producción de citoquinas por parte de células NK (Ralainirina *et al.* 2007). Además, modulan la presentación antigénica de las CD, volviéndolas tolerogénicas. A través de la expresión de CTLA-4, los Treg pueden regular negativamente la expresión de las moléculas de co-estímulo (Sakaguchi 2004) e inducir un aumento de la actividad de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (Fallarino *et al.* 2003). La producción de citoquinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10 es otro de los mecanismos de actuación de los Treg sobre el resto de las poblaciones efectoras con carácter antitumoral. Por otro lado se ha observado que las células Treg son reclutadas al nicho tumoral por la influencia de la quimioquina CCL22 (Curiel *et al.* 2004).

4.3.2.1.b. Células supresoras de origen mieloide (MDSC)

Las MDSC constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuestas por macrófagos, granulocitos, CD y otras poblaciones de origen mieloide en estadios tempranos de diferenciación que ejercen una actividad inmunosupresora en el ambiente tumoral. Existen principalmente dos subpoblaciones dentro de las MDSC, las granulocíticas (definidas como Ly6G⁺ Ly6C^{Low}) y las células monocíticas (definidas como Ly6G⁻ Ly6C^{High}), que se acumulan en el bazo, y en algunos casos en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor (Bronte *et al.* 1998; Gabrilovich *et al.* 2001; Terabe *et al.* 2003; Li *et al.* 2004). La actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través

de su capacidad de inhibir la producción de IFN- γ producida por los LTc en respuesta a péptidos provenientes de antígenos tumorales presentados en la superficie de las propias MDSC (Gabrilovich *et al.* 2001). Este efecto depende de la expresión de MHC-I por las MDSC y no es mediado por factores solubles sino que requiere del contacto célula-célula (Gabrilovich *et al.* 2009). Estudios recientes *in vivo* han demostrado que las MDSC también pueden ser responsables de inducir tolerancia antígeno-específica de LT (Kusmartsev *et al.* 2005). Las MDSC son capaces de endocitar proteínas solubles *in vivo*, procesarlas y luego presentar los péptidos antigénicos e inducir anergia en los LT específicos (Kusmartsev *et al.* 2005). La subpoblación de células MDSC Gr-1⁺ CD115⁺, además de ser capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de LT, promueve la expansión de Treg *in vivo*, siendo dependiente de la presencia de IFN- α e IL-10 (Huang *et al.* 2006). Curiosamente, mientras que las MDSC suprimen la proliferación de LT inducida por mitógenos a través de una vía dependiente de óxido nítrico (NO), la inhibición de la respuesta alogénica inducida por estas células es mediada por la enzima arginasa-1 (Bronte *et al.* 2003). Se observó además que las MDSC Gr-1⁺ se diferencian *in vitro* e *in vivo* a macrófagos F4/80⁺, que en el interior del microambiente tumoral producen niveles sustanciales de NO, pudiendo inducir de forma directa la apoptosis de LT.

4.3.2.1.c. Macrófagos asociados al tumor (TAM)

Los TAM son células con varias funciones pro-tumorales, incluyendo promoción de la angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular y supresión de la respuesta inmunitaria antitumoral efectora. En tumores ya establecidos, los trabajos publicados demuestran que los TAM poseen un fenotipo M2 (macrófagos activados por la vía alternativa) caracterizado por su baja producción de IL-12 y niveles incrementados de IL-10 y TGF- β , favoreciendo el escape tumoral. Ocurre todo lo contrario con los macrófagos de fenotipo M1 (macrófagos activados por la vía clásica) que son capaces de eliminar células tumorales y producen citoquinas proinflamatorias (Mantovani *et al.* 2005). Los TAM pueden inhibir la respuesta T anti-tumoral mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de kinureninas (producto

de la actividad de la enzima IDO) (Bronte *et al.* 2003; Pollard 2004) y atrayendo a los Treg al nicho tumoral (Woo *et al.* 2001). Además, pueden bloquear la respuesta efectora a través de la expresión de B7-H4, regulando negativamente la activación de los LT (Kryczek *et al.* 2006) y participar en la remodelación de la matriz extracelular a través de la producción de altos niveles de diferentes metaloproteasas (Condeelis *et al.* 2006). Por otro lado, pueden producir VEGF, estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos y facilitando la entrada de células tumorales en el torrente sanguíneo, un paso muy importante en el proceso de metástasis (Wyckoff *et al.* 2004).

4.3.2.1.d. Células dendríticas

Si bien se ha descrito que células tumorales pueden inducir la maduración de CD inmaduras, datos publicados recientemente indican que un defecto en la activación de CD se encuentra entre los principales factores responsables del escape tumoral, afectando fundamentalmente a la respuesta de LTh1 y LTc. En este sentido, ratones inoculados con diferentes tipos de tumores presentan una marcada reducción en el número y funcionalidad de CD (Ishida *et al.* 1998). Este fenómeno ha sido demostrado claramente en pacientes que presentan tumores infiltrados por CD con fenotipo inmaduro demostrando una mayor agresividad (Troy *et al.* 1998). Esto se ha observado en CD aisladas de metástasis de melanomas y carcinomas basocelulares (Chaux *et al.* 1997; Enk *et al.* 1997; Nestle *et al.* 1997). Notablemente, la incorporación del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y TNF- α o de CD40L a cultivos *in vitro* no promueve un incremento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en CD infiltrantes de tumores (Chaux *et al.* 1997). Sin embargo, se ha demostrado que si las CPA fallan en proveer una apropiada señal co-estimuladora a los LT, éstos se volverán tolerantes o anérgicos. En este contexto, CD provenientes de tejidos tumorales, como por ejemplo cáncer de colon o melanoma, no sólo fueron incapaces de inducir la proliferación de LT, sino que además dieron lugar a anergia y un estadio de tolerancia en estos LT (Chaux *et al.* 1997; Enk *et al.* 1997; Nestle *et al.* 1997). Al mismo tiempo, se han descrito subtipos de CD con fenotipo maduro y con potencial inmunosupresor sobre los LT. Las más predominantes fueron las pCD

(Colonna *et al.* 2004). La regulación negativa del receptor TLR9 inducida por el tumor podría ser el mecanismo responsable de inhibir las funciones de las pCD dentro del microambiente tumoral (Hartmann *et al.* 2003). Así, se ha descrito la acumulación de pCD en el área peritumoral de melanomas primarios (Vermi *et al.* 2003). Además se demostró que los ganglios linfáticos drenantes de tumores de ratón, contienen una subclase de pCD que expresan constitutivamente la enzima IDO, lo que inhibe la expansión clonal de LT y promueve su apoptosis (Munn *et al.* 2004). Por lo tanto, mCD y/o pCD pueden contribuir a crear o potenciar los mecanismos inmunosupresores.

4.3.2.2. Factores solubles

En los tumores existen factores solubles que favorecen la progresión del proceso neoplásico, como las citoquinas inmunosupresoras. El carácter pleiotrópico de estas citoquinas hace difícil determinar cuál en particular es la responsable de la progresión de un tumor determinado. Esto se debe a la relación con otras citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, que actúan simultáneamente en el nicho tumoral. El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y la interleuquina-10 (IL-10) son las citoquinas con mayor efecto inmunosupresor (Salazar-Onfray 1999).

4.3.2.2.a. TGF- β

TGF- β es una citoquina con efectos pleiotrópicos implicada en muchos procesos celulares (Kim *et al.* 2005). Debido a sus propiedades antiproliferativas, esta citoquina ha sido considerada como inmunosupresora y antiinflamatoria, aunque también puede actuar como estimuladora de algunas poblaciones celulares del sistema inmunitario (Li *et al.* 2006). De este modo, se ha descrito que TGF- β inhibe la diferenciación y actividad de las células T y B (Kehrl *et al.* 1986; Gorelik *et al.* 2002), impide la maduración de CPA como las CD (Kobie *et al.* 2003) e inhibe la actividad de otras células del sistema inmunitario innato como las células NK (Rook *et al.* 1986). Sin embargo, TGF- β es también necesario como un importante factor de diferenciación de las células Treg (Chen *et al.* 2003). Estas propiedades del TGF- β permiten un control homeostático de las reacciones inmunes bajo condiciones normales.

Por otra parte, se sabe que TGF- β está sobreexpresado en algunas patologías malignas (Niitsu *et al.* 1988; Sargent *et al.* 1989; Ito *et al.* 1991) y en enfermedades infecciosas (Kekow *et al.* 1990; Schultz-Cherry *et al.* 1996; Nelson *et al.* 1997; Reed 1999). En algunos tumores se han descrito altos niveles de esta citoquina, que en fases tempranas es capaz de inhibir el crecimiento tumoral, pero en fases más tardías promueve y es responsable de la aparición de metástasis (Chang *et al.* 1993). Experimentos realizados en animales indican que la mayor actividad de TGF- β *in vivo* es la promoción de la invasión y la metástasis (Arteaga *et al.* 1993). En seres humanos, TGF- β ha sido involucrado en el aumentado potencial metastásico de melanomas y otros carcinomas (Friedman *et al.* 1995). *In vitro*, TGF- β inhibe la expansión de los LTc y de los LB, además inhibe la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad inactivando a las células T y NK (Arteaga *et al.* 1993; Wright *et al.* 1993). Por otro lado, se ha observado que el número de células Treg aumenta tanto en el microambiente tumoral como en la periferia. Estos mecanismos pueden impedir la inducción de la respuesta inmunitaria capaz de eliminar a las células malignas (Banchereau *et al.* 2005).

4.3.2.2.b. IL-10

La interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina con gran capacidad inmunoreguladora. Es producida por las propias células tumorales, así como por los LTh2 y CPA cuando son estimuladas por PAMPs (von Andrian *et al.* 2000; Giordani *et al.* 2003). Constitutivamente se encuentra expresada por las Treg, que son la principal fuente de IL-10 junto con los macrófagos activos (van Broekhoven *et al.* 2004; Salem *et al.* 2005). También se ha demostrado que, en determinadas condiciones, incluso los LTh1 pueden producir IL-10 (Saraiva *et al.* 2010).

IL-10 ejerce sus efectos inmunoreguladores tanto a nivel de la respuesta inmunitaria innata, actuando principalmente sobre las CPA, impidiendo la diferenciación de los monocitos en CD y disminuyendo la actividad efectora de los neutrófilos, como a nivel de la respuesta inmunitaria adaptativa, afectando sobre todo a la proliferación y actividad de los LT. En las CPA actúa inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 o IL-18, así como la

expresión de MHC de clase II, moléculas co-estimuladoras o moléculas de adhesión y migración. Además estimula la producción deIDO por parte de las CPA, lo que junto con los cambios anteriormente descritos, lleva a la inhibición indirecta de la proliferación y a la estimulación de la apoptosis de los LT. IL-10 afecta además de forma directa la función de los LTh mediante la inhibición de la expresión de IL-2, TNF- α , IL-5, el receptor de quimiocinas CXCR4, el receptor de IL-2 (CD25), y la respuesta al factor 1 derivado de células estromáticas (Asadullah *et al.* 2003; Saraiva *et al.* 2010). También suprime la expresión de MHC-I en las CPA, disminuyendo la respuesta de los LTc anti-tumorales.

En diferentes estudios clínicos se ha mostrado un incremento en los niveles de IL-10 en sueros de pacientes con melanoma (Sato *et al.* 1996) y otros tumores sólidos (Fortis *et al.* 1996), así como la expresión de IL-10 por las propias células tumorales (Bellone *et al.* 1999; Herbeuval *et al.* 2004; Todaro *et al.* 2006).

4.3.2.3. Otros mecanismos

Existen otros mecanismos que también actúan como factores inmunosupresores como son el óxido nítrico (NO), producto de la acción de distintas isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) sobre la arginina, las prostaglandinas generadas por ciclooxigenasas (COX) y la arginasa, teniendo como sustrato también la arginina. Estas enzimas promueven la progresión de los tumores e inhiben la expresión de los TCR y respuestas antígeno-específicas (Rodríguez *et al.* 2004).

Otra enzima que está teniendo en los últimos años un gran interés en el contexto de los tumores es IDO. Esta enzima está regulada por varios estímulos inflamatorios, teniendo un efecto inmunosupresor que induce la inmunotolerancia y suprime la actividad de las células T (Hassanain *et al.* 1993; Mellor *et al.* 2004). Su función hasta ahora no es enteramente conocida. Se sugiere que IDO tiene capacidad de regular el sistema inmunitario a través de dos vías: mediante la privación de triptófano, esencial para la proliferación de LT, y mediante el efecto citotóxico de los metabolitos del triptófano. IDO está

sobreexpresada en una alta variedad de tumores humanos y algunos estudios la correlacionan con la progresión de la enfermedad y una reducción en la supervivencia (Mosolits *et al.* 2005).

En CD infiltrantes de tumores colorrectales, IDO participa en la inmunidad tumoral local (Dadabayev *et al.* 2004). Se ha descrito que en ratones, IDO expresada por las pCD puede crear un ambiente inmunosupresor en los nódulos linfáticos drenantes del tumor, suprimiendo la respuesta de los LT frente a antígenos presentados por ellas o por CPA que no sean inmunosupresoras (Munn *et al.* 2004).

5. ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmunitaria y su caracterización en los pacientes con cáncer han permitido el diseño de nuevas estrategias de inmunoterapia cuyo objetivo principal es la inducción de respuestas antitumorales (Waldmann 2003). Para ello es necesario conocer bien las condiciones de la enfermedad, los posibles efectos de la terapia, así como el impacto sobre el sistema inmunitario y sus posibles consecuencias. De este modo, el uso de inmunomoduladores y/o inmunoestimuladores puede ayudar a restablecer el coordinado y eficaz funcionamiento de la respuesta inmunitaria, actuando a diferentes niveles del sistema inmunitario para inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células implicadas en la respuesta inmunitaria.

5.1. Inmunopotenciación

Una de las estrategias de inmunopotenciación de la respuesta antitumoral son las vacunas, encaminadas a la activación de respuestas adaptativas frente a los antígenos tumorales específicos. La síntesis de péptidos, la secuenciación de nucleótidos y la ingeniería genética han posibilitado el desarrollo de las denominadas “*vacunas de nueva generación*”. Sin embargo, el éxito de estas nuevas tecnologías requiere un estudio previo para hallar nuevos adyuvantes, sustancias eficaces en la estimulación de la respuesta inmunitaria y desprovistas de propiedades biológicas adversas. En la

actualidad, para conseguir una respuesta antigénica eficaz se pueden utilizar distintas combinaciones de una gran variedad de inmunógenos (péptidos, proteínas, virus recombinantes, etc.) administrados en diferentes vehículos (células dendríticas, liposomas, anticuerpos, proteínas, salino, etc.) y utilizando distintos adyuvantes (estímulos de maduración de CD como ligandos de TLR o agonistas de otros receptores de CD, moléculas co-estimuladoras, etc.).

5.1.1. Adyuvantes

Las proteínas y los péptidos antigénicos potencialmente útiles en inmunoterapia presentan en general una inmunogenicidad muy pobre, puesto que a diferencia de los microorganismos, carecen de PAMPs capaces de estimular a las CD y de este modo activar a los linfocitos. Para ello se necesita combinarlos con diversos adyuvantes y/o vehículos que activarán a la inmunidad innata (Kim *et al.* 1998).

En el caso de los PAMPs, su unión a los PRR induce la maduración de las CD *in vivo*, promoviendo la producción de mediadores proinflamatorios como citoquinas, NF- κ B, y moléculas de co-estímulo, que van a estimular tanto el sistema inmunitario innato como adaptativo (Aderem *et al.* 2000; Werling *et al.* 2003; Pasare *et al.* 2004). Por eso la incorporación de estas moléculas en las vacunas aumenta su inmunogenicidad (Kaisho *et al.* 2002; Werling *et al.* 2003; Guy 2007). Entre las moléculas capaces de activar a las CD que ya están aprobadas para su uso clínico o en fases avanzadas de desarrollo destaca el Imiquimod, un agonista sintético de TLR7 con efectos antivirales (Wang *et al.* 2005) y antitumorales (Chuang *et al.* 2010) y poly (I:C), un análogo sintético de RNA de cadena doble capaz de unirse a TLR3. Estos receptores no sólo se expresan en CD sino también en células NK, macrófagos (Banchereau *et al.* 1998) y LTh (Gelman *et al.* 2004). Estas moléculas, además de madurar eficazmente a las CD, contribuyendo a la presentación antigénica y a la producción de citoquinas proinflamatorias (Hemmi *et al.* 2002), están asociadas con una rápida activación de las células NK, que colaboran en la rápida inducción de citoquinas proinflamatorias como IFN tipo I, TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-15, y al aumento de la proliferación de la proliferación de LTc.

Además de los PAMPs, existen moléculas endógenas con carácter inflamatorio que contribuyen a la activación de la respuesta, como el ligando de CD40 (CD40L). Su interacción con CD40, da lugar a una fuerte activación de las células del sistema inmunitario (Van Kooten *et al.* 1996). CD40 es un miembro de la familia de receptores de TNF que se expresa en CD, macrófagos y células B. Existen numerosos trabajos que muestran que la interacción entre el CD40 y su ligando, interviene de manera decisiva en la activación de los LTc por parte de las CPA (Bennet *et al.* 1998), e induce la proliferación de las células memoria de una forma parcialmente dependiente de IL-15 (Koschella *et al.* 2004). Por ello, anticuerpos agonistas de CD40 se utilizan como adyuvantes internos en vacunación.

Sin embargo, el desafío en la búsqueda de adyuvantes para inmunoterapia se centra en obtener el “*mix perfecto*”, con diferentes componentes que no sean sólo aditivos sino sinérgicos y que potencien finalmente la respuesta inmunológica deseada (Guy 2007). Se ha demostrado que la combinación de antígenos con agonistas de CD40 y TLRs muestra potentes sinergias, con respuestas celulares eficientes frente a infecciones crónicas y tumores (Ahonen *et al.* 2004; Zabaleta *et al.* 2007; Wells *et al.* 2008)

5.1.2. Proteínas recombinantes de fusión basadas en el dominio extra A de la fibronectina (EDA)

Además de las propiedades inmunoestimuladoras, el efecto de vehículo es otra de las características de algunos adyuvantes. Aquellas moléculas que favorecen la disponibilidad, captura o interacción del antígeno con las CPA habitualmente aumentan su inmunogenicidad. Varios grupos han encontrado que la unión covalente de un antígeno a ligandos de TLR (por ejemplo, de TLR5 como flagelina (Cuadros *et al.* 2004), de TLR9 como los CpGs (Tighe *et al.* 2000) o una combinación de TLR3 y TLR7/8 (Tacke *et al.* 2011)), son capaces de dirigir antígenos a las CD *in vivo*, de fomentar su presentación y, por tanto, de favorecer la iniciación de una respuesta inmunitaria específica frente a esos antígenos. De igual manera, también ejercen esta función otros receptores de las CD (como complejos de fusión recombinantes basados en la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* que se unen al complejo CD11b/CD18

(Fayolle *et al.* 1999; Guermonprez *et al.* 2001)), o anticuerpos monoclonales específicos de moléculas de superficie de las CD (Bonifaz *et al.* 2004; Sancho *et al.* 2008),

Nuestro grupo ha demostrado que el dominio extra A de la fibronectina (EDA), cuando se une covalentemente a antígenos peptídicos o proteicos, es capaz de comportarse como vehículo para dichos antígenos y aumenta su inmunogenicidad. Esto se debe a que EDA se une al receptor TLR4, y su unión a este receptor induce la producción de citoquinas proinflamatorias (Okamura *et al.* 2001). De este modo, EDA no sólo se comporta como vehículo sino también como inmunoestimulador. Se ha caracterizado su efecto induciendo respuestas T citotóxicas *in vivo* (Lasarte *et al.* 2007) y se ha utilizado en modelos de inmunización frente al virus de la hepatitis C con la proteína NS3 (Mansilla *et al.* 2009) y frente al cáncer de cérvix, fusionando EDA con la proteína E7 del papilomavirus humano (Mansilla *et al.* 2011).

Con todo esto, la combinación de adyuvantes junto con la administración de un antígeno específico unido covalentemente a la proteína EDA (**Figura I5**), se presenta como una estrategia inmunopotenciadora prometedora frente a antígenos poco inmunogénicos.

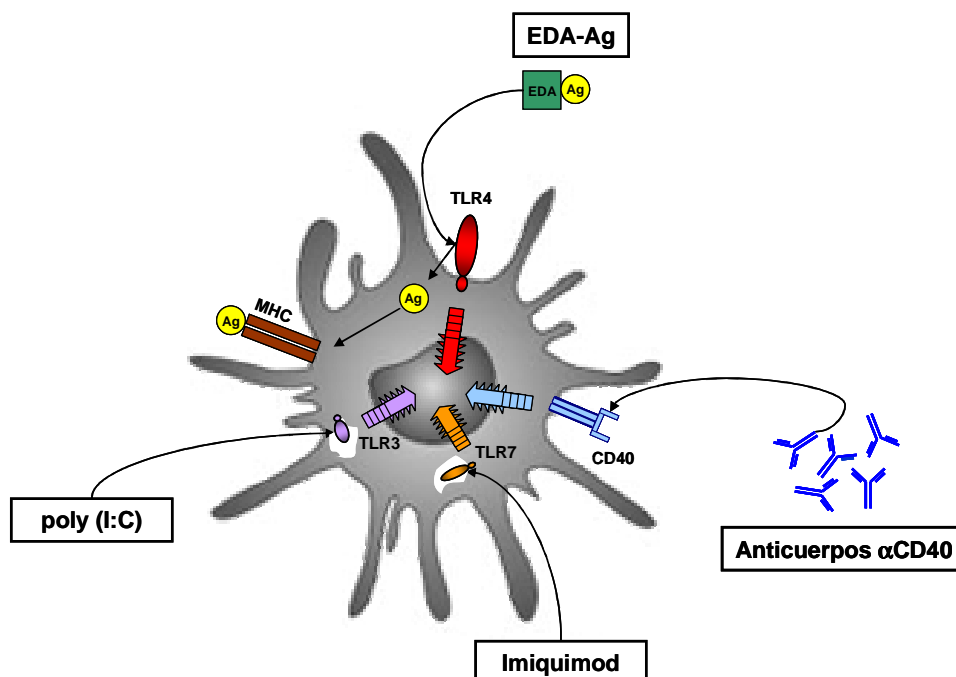


Figura I5. Estrategia de inmunoterapia utilizada en este trabajo.

5.2. Inhibición de los mecanismos inmunosupresores

En los últimos años, diferentes autores han sugerido que la combinación de estrategias de inmunopotenciación con la inhibición de mecanismos inmunosupresores podría potenciar el efecto de las primeras en la inmunoterapia antitumoral. Estas estrategias están destinadas a revertir el estado de inmunosupresión de los portadores de tumor, siendo un área de investigación muy activa (Berzofsky *et al.* 2012). Uno de los cambios en la inmunoterapia del cáncer ha sido el desarrollo de moléculas que inactivan la actividad de células o factores inmunosupresores, bien inhibiendo receptores y/o ligandos, o citoquinas que se encuentran en el ambiente tumoral (Weber 2010; Brahmer *et al.* 2012).

La identificación del amplio universo de factores reguladores es crucial para comprender los mecanismos de inmunosupresión que impiden el desarrollo de una respuesta inmunitaria antitumoral y obstaculizan el éxito de estrategias inmunoterapéuticas. Cada vez son más importantes los trabajos dirigidos a conocer cómo se reclutan de forma diferencial dichas células y factores en el entorno tumoral y qué controla la interacción entre los diferentes tipos de células reguladoras. Como concepto emergente de este análisis se postula la necesidad de considerar en el futuro la incorporación de estrategias que controlen la actividad de factores y/o células con actividad inmunosupresora junto con las herramientas terapéuticas antitumorales tradicionales.

Con este objetivo, se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas ubicadas en la superficie de Treg, como CD25 y CTLA-4, con el propósito de disminuir su cantidad y/o bloquear su función. En un estudio reciente, el uso de anti-CTLA-4, anti-CD25 o anti-GITR en ratones portadores de tumor (sarcoma y cáncer de colon) mostraron una leve disminución en el crecimiento tumoral. Solamente la combinación entre anti-CTLA-4 y anti-GITR condujo al rechazo tumoral en el 80% de los casos (Mitsui *et al.* 2010). Otros receptores que también han mostrado su interés en la inmunoterapia del cáncer son PD-1/PD-L1, donde han mostrado tener una relevancia importante en ratones con melanoma y sinergia cuando se combina su bloqueo con anti-

CTLA-4. Se ha demostrado que el bloqueo de las vías inhibitoras a menudo conduce a mejorar la función efectora y expansión de los LTc en el microambiente tumoral (Curran *et al.* 2010). En este sentido, habría que destacar que, tras la finalización de los ensayos clínicos en fase III (Hodi *et al.* 2010; Robert *et al.* 2011), recientemente ha sido aprobada por la FDA estadounidense (*Food Drug Administration*) la utilización clínica en humanos del fármaco *Yervoy* (nombre comercial del anticuerpo bloqueante de CTLA-4 Ipilimumab) para el tratamiento del melanoma no resecable o metastásico.

En cuanto a la posibilidad de inhibir la función de MDSC se han investigado los efectos de algunos fármacos como el retinol, la vitamina D, inhibidores de COX-2 y otros. Estas terapias están dirigidas a promover la diferenciación de las MDSC a células maduras sin actividad supresora (Gabrilovich *et al.* 2009). Por otra parte, un estudio reciente (Kao *et al.* 2011) demostró que la administración de sunitinib, un inhibidor de receptores tirosina-kinasa, impide la acumulación de MDSC en modelos murinos de carcinoma de mama, colon o riñón y también en sangre periférica de pacientes con carcinoma renal.

También resulta importante la inhibición de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , unas de las más importantes citoquinas inmunosupresoras. En algunas estrategias, utilizando anticuerpos neutralizantes, proteínas solubles capaces de unirse a estas citoquinas o pequeñas moléculas diana inhibitoras, se ha demostrado que la inhibición de estas citoquinas potencia la respuesta antitumoral (Llopiz *et al.* 2009; Bolpetti *et al.* 2010; Lu *et al.* 2010) .

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Desde los comienzos de la inmunoterapia, su objetivo principal ha sido la inducción de respuestas inmunitarias eficaces, capaces de eliminar patógenos o neoplasias malignas que no hayan sido eliminadas espontáneamente por el sistema inmunitario. Por ello, el desarrollo de vacunas para tratar enfermedades infecciosas crónicas o tumores, continúa siendo una prioridad en la investigación médica. En los últimos años se han desarrollado estrategias de inmunoterapia capaces de inducir respuestas inmunitarias potentes y multiepitópicas, algunas de las cuales se encuentran en ensayos clínicos. Sin embargo, en la mayoría de estos ensayos, las respuestas inducidas son insuficientes para conseguir la curación de la enfermedad. De este modo, es necesario optimizar las estrategias de inmunoterapia para obtener mejores resultados. Con esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Desarrollar una estrategia de vacunación terapéutica encaminada a la potenciación de la respuesta inmunitaria mediante la administración de combinaciones de adyuvantes y antígenos. Estudiar sus efectos anti-tumorales en un modelo de tumor poco inmunogénico.**
- 2. Estudiar el efecto antitumoral de la combinación de estrategias de vacunación terapéutica junto con el bloqueo de las citoquinas inmunosupresoras TGF- β e IL-10.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares descritas en este apartado se cultivaron en incubadoras estándar a 37 °C y con un 5% de CO₂, en frascos de cultivo de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania).

- La línea celular **B16-F10** (ATCC CRL-6475), derivada de células de melanoma de ratones C57BL/6 tras aislarse 10 metástasis de pulmón (Fidler 1975), fue cedida por el Dr. G.Kroemer (París, Francia). Estas células se cultivaron en medio DMEM (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Scotland, Reino Unido), antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) y 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol.
- Las células tumorales **B16-OVA** derivan de transfectar la línea celular B16-F10 con el DNA que codifica la proteína ovalbúmina (OVA) de la clara de huevo del pollo. Se cultivaron en el mismo medio que las células B16-F10, pero suplementado con 400 µg/ml del antibiótico de selección genética (G418, Invitrogen).
- La línea celular **EL-4** (ATCC TIB-39), aislada de timoma en ratones C57BL/6, se cultivó en medio RPMI-1640 (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con 10% de FBS, antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) y 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol. A partir de ahora nos referiremos a este medio como medio completo (MC).
- Las células tumorales **EG7-OVA** (ATCC CRL-2113) derivan de la transfección de la línea celular EL-4 con el DNA que codifica OVA. Se cultivaron en MC suplementado con 400 µg/ml de genética.
- La línea celular **YAC-I** (ATCC TIB-160) deriva de un linfoma inducido por el virus de la leucemia de Moloney en ratones A/Sn. Esta línea celular se caracteriza porque no expresa MHC de clase I. Por esta razón se ha utilizado como diana clásica para estudiar la actividad de las células NK. Se cultivaron en MC.

- Las células **THP-1** (ATCC TIB-202), derivadas de monocitos humanos, se cultivaron en MC y se utilizaron para estudiar la capacidad de las proteínas para inducir producción de citoquinas proinflamatorias.

1.1. Análisis de la expresión del antígeno tumoral OVA en líneas celulares

Para medir la expresión de OVA en células EG7-OVA, B16-OVA, EL- 4 y B16-F10 se extrajo el RNA de las células (5×10^4) con la ayuda de una solución de lisis para la purificación de ácidos nucleicos (Applied BioSystems, Foster City, CA, EE.UU.) y el sistema semi-automático *ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied BioSystems). El RNA total se trató con DNAsa (Gibco-BRL, Paisley, Reino Unido) antes de realizar la transcripción reversa con la transcriptasa reversa M-MLV (Gibco-BRL) en presencia de RNAsaOUT (Gibco-BRL). Para realizar la PCR cuantitativa se utilizó el termociclador CFX (Bio-Rad) e *IQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad). Cada PCR se realizó con 1 μ l de cDNA y con cebadores específicos de OVA (**Tabla M1**). Para determinar la especificidad de estos ensayos, los productos finales de la PCR se analizaron mediante curvas de puntos de fusión y electroforesis, y los resultados se normalizaron con β -actina. La cantidad relativa de cada transcrito se expresó utilizando el software de análisis de Bio-Rad, mediante la fórmula $2^{\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct(\beta\text{-actina}) - Ct(\text{gen})$), siendo Ct el ciclo por encima del cual el programa considera la PCR positiva. Estas pautas se llevaron a cabo con todos los análisis de este trabajo para estudiar la expresión del RNA en diferentes genes con sus respectivos cebadores específicos. Todos los ensayos de análisis de la expresión del RNA fueron llevados a cabo con la colaboración del Dr. José Ignacio Riezu-Boj, de nuestro departamento.

Gen	Cebador Sentido (5'- 3')	Cebador Antisentido (5'- 3')
OVA	TATTCG TTCAGCCTTGCCAG	CTTTCTCCCACAGTCCTTTG
β -actina	CGCGTCCACCCGCGAG	CCTGGTGCCTAGGGCG

Tabla M1. Secuencia de los cebadores utilizados para el análisis del RNA

1.2. Análisis de la expresión de moléculas de MHC en líneas celulares

Para medir la expresión de las moléculas de MHC de clase I K^b en las células tumorales se utilizó un anticuerpo anti-H-2 K^b marcado con *fluorescein isothiocyanate* (FITC) (clon AF6-88.5). Grupos equivalentes se incubaron con el correspondiente isotipo marcado con FITC (IgG2a κ de rata) (clon R35-95). Todas las incubaciones con anticuerpos en este trabajo se realizaron a 4 °C, en PBS con 2% de FBS y durante 15 minutos. A continuación se lavaron las células y se analizaron los marcadores mediante citometría de flujo (FACs Calibur™, Becton Dickinson, CA, EE.UU.) y el programa *Flowjo* (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE.UU.). Todos los anticuerpos utilizados en este trabajo para ensayos de citometría eran de BD Biosciences.

En algunos casos, las células tumorales se estimularon *in vitro* con IFN- γ recombinante de ratón (Peprotech, NJ, EE.UU.) a una concentración de 500 U/ml durante 48 horas para estudiar la expresión de MHC-I. Estas células se lavaron dos veces con PBS antes de ser utilizadas para los ensayos.

2. ANTÍGENOS

2.1. Péptidos

Los péptidos DTc de la proteína TRP2, TRP2(180-188) (SVYDFVWL), y de ovalbúmina, OVA(257-264) (SIINFEKL), fueron sintetizados por la empresa NeoMPS (Estrasburgo, Francia). La pureza de los péptidos fue analizada por HPLC y fue superior al 95%.

2.2. Proteínas

La proteína recombinante OVA detoxificada se obtuvo de Endograde (Múnich, Alemania). Se encontraba cristalizada y liofilizada, y había sido previamente purificada por cromatografía y almacenada a 4 °C. Su pureza era del 98% aproximadamente y se disolvió en PBS.

Las proteínas de fusión EDA-antígeno se construyeron y purificaron en el laboratorio del Dr. Juan José Lasarte, del Área de Terapia Génica y Hepatología del CIMA.

La proteína EDA-OVA se encargó a la empresa 3P Biopharmaceuticals (Pamplona). Su producción y purificación se realizó siguiendo los protocolos que se habían establecido en el laboratorio (Lasarte *et al.* 2007). La pureza de estas proteínas fue determinada por tinción Azul de Coomasie y Western Blot.

En el caso de la proteína EDA-TRP2, a partir del molde de cDNA de TRP2 cedido por Viktor Umansky (German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) se digirió con NotI y el fragmento se subclonó en el plásmido pET20b-EDA, previamente digerido con NotI, para obtenerse la construcción EDA-TRP2(59-257). Se siguieron los mismos protocolos de producción y purificación utilizados para la proteína EDA-OVA.

La actividad biológica de EDA-TRP2(59-257), denominada de ahora en adelante EDA-TRP2, se analizó mediante un bioensayo que determinaba su capacidad de activar la producción de citoquinas proinflamatorias por la línea celular TLR4⁺ THP-1. Para ello se incubaron las células THP-1 (10⁶ células/pocillo) con las proteínas a una concentración de 1 μM, LPS (0,1 μg/ml) como control positivo o MC como control negativo. En algunos casos, la proteína EDA-TRP2 fue previamente tratada con proteinasa K-sepharosa y posteriormente añadida a los cultivos como control. A las 16 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de TNF-α humano mediante un ensayo de ELISA comercial (OptEIA ELISA Set, BD Biosciences), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se analizó también la actividad biológica de la proteína EDA-TRP2 inmunizando ratones y reestimulando sus

células linfoides con el péptido TRP2(180-188) para medir la producción de IFN- γ .

3. RATONES

Se utilizaron ratones hembras de 7 - 8 semanas de edad. Todos ellos se mantuvieron con los cuidados y condiciones adecuadas, siguiendo las normas institucionales requeridas para la experimentación con animales.

- **C57BL/6J** (Harlan, Barcelona) que presentan una restricción H-2^b para el complejo principal de histocompatibilidad.
- Ratones atímicos **Nude-Foxn1^{nu}** (Harlan), animales inmunodeficientes que se emplearon para la producción de líquido ascítico y obtención de anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD40, con la previa implantación del hibridoma correspondiente.

Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

4. ENSAYOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS

4.1. Diferenciación de células dendríticas de ratón a partir de precursores de médula ósea

Para la generación de CD de ratón a partir de precursores de médula ósea se extrajeron las médulas de fémur y tibia y se lisaron los eritrocitos utilizando una solución de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM). A continuación se realizó un lavado con RPMI 1640 y se procedió a eliminar los linfocitos y granulocitos mediante la incubación con una mezcla de anticuerpos frente a las distintas poblaciones celulares junto con complemento de conejo. Esta depleción se realizó a una concentración de 2 x 10⁷ células/ml en RPMI y se utilizaron los siguientes componentes:

- Anticuerpo anti-CD4, obtenido a partir del hibridoma GK1-5 (Dialynas *et al.* 1983), utilizado a una concentración de 100 µg/ml.
- Anticuerpo anti-CD8, obtenido a partir del hibridoma H35.17.2 (Pierres *et al.* 1982), utilizado a una concentración de 100 µg/ml.
- Anticuerpo anti-Ly-6G/Gr1 (BD Biosciences) a 10 µl/ml.
- Anticuerpo anti-CD45R/B220 (BD Biosciences) a 15 µl/ml.
- Complemento de conejo (Sigma Aldrich, Madrid) a 50 µg/ml.

Para la obtención de los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, se inyectó 500 µl de pristano (Tetrametil pentadecano, Sigma) a ratones Nude, y 7 - 10 días después se les inyectó 6×10^6 células del hibridoma correspondiente en 500 µl de PBS por vía intraperitoneal. Una vez extraído el líquido ascítico, los anticuerpos se precipitaron con una solución saturada de sulfato amónico, y el precipitado se disolvió en PBS. Esta solución se dializó frente a PBS en un "cassette" de diálisis de 3,5 kDa durante 20 horas a 4 °C. La solución que se obtuvo se centrifugó a 2200 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado para en último lugar cuantificar la proteína, midiendo la absorbancia a 280 nm (se consideró un coeficiente de extinción para proteína igual a 1,35 unidades de D.O. para 1 mg/ml de IgG).

La mezcla de células, anticuerpos y complemento se incubó a 37 °C durante 50 minutos agitando suavemente cada 20 minutos. Tras la incubación se realizó un lavado y las células resultantes se cultivaron a una concentración de 10^6 células/ml en placas de 12 pocillos (Iwaki, Japón) en MC suplementado con 20 ng/ml de las citoquinas de ratón GM-CSF e IL-4 (ambas de Peprotech, Londres, Reino Unido).

Cada dos días se reemplazaron dos terceras partes de medio por medio fresco suplementado con citoquinas, y el día seis se recogieron las células.

4.2. Estudio de las propiedades de las células dendríticas

4.2.1. Estimulación *in vitro* de las células dendríticas

Las CD fueron estimuladas para estos ensayos con diferentes combinaciones de Imiquimod-R837 (5 µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA, EE.UU.), anticuerpos agonistas anti-CD40 de ratón (50 µg/ml) que se obtuvieron a partir del hibridoma FGK45.5 como se describe en el apartado 4.1, ácido poliinosínico policitidínico (poly (I:C)) (50 µg/ml) (Amershan, Barcelona) y EDA (2 µM).

4.2.1.1. Producción de citoquinas

Transcurridas 24 horas de incubación con los diferentes estímulos se recogió el sobrenadante y se midió la cantidad de IL-12 o IL-10 mediante un ELISA comercial (ambos OptEIA Mouse ELISA Set, BD Biosciences) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como ng/ml y se calcularon utilizando una curva estándar con cantidades conocidas de estas citoquinas.

4.2.1.2. Análisis de la expresión de RNAm

Se midió la expresión de RNAm para diferentes genes mediante PCR a tiempo real. El procedimiento fue igual al explicado en el apartado 1.1. Cada PCR se realizó con los cebadores específicos de cada gen (**Tabla M2**).

Gen	Cebador Sentido (5'- 3')	Cebador Antisentido (5'- 3')
OX40L	AGTGGAAGAAGACGCTAAGG	TCCTCACATCTGGTAACTGC
4-1BBL	AGTCGCTTTGGTTTTGCTGC	ACGATGCTTGGTTTTTAGCC
CD70	CTCAGTAAGCAGCAACAGAG	TTGATGGATACGCAGATGGC
IL-15	TAACTGAGGCTGGCATTTC	GGGATGAAAGTCACTGTC
IL-12 p35	CACGCTACCTCCTCTTTTTTG	AGGCAACTCTCGTTCTTGTG
IFN- α	TCTTTCTTGTCTGAAGGAC	CACAGTGGCTGTGTTTCTTC

Tabla M2. Secuencia de los cebadores utilizados para el análisis del RNA de las células dendríticas de ratón.

4.2.2. Análisis *ex vivo* de la maduración de las células dendríticas

Para el análisis *ex vivo* de la maduración de las CD, 24 horas tras la administración de las diferentes combinaciones de antígeno y adyuvantes a ratones con tumor, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores y los correspondientes nódulos linfáticos de drenaje. Se trataron con 400 U/ml de colagenasa tipo IV y DNAsa I (Boehringer Mannheim, Alemania) en RPMI a 37 °C durante 45 minutos (Moron *et al.* 2002). Tras la inhibición de la colagenasa con 6 mM EDTA y 0,5% de FBS, las células se incubaron con anticuerpo anti-CD16/32 de rata o Fc Block™ (clon 2.4G2) (BD Biosciences) y con esferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-CD11c de ratón (MACs anti-CD11c, clon N418; Miltenyi Biotec, Alemania). De acuerdo con las indicaciones del fabricante, las células CD11c⁺ fueron purificadas magnéticamente utilizando el equipo *AutoMACS* y el programa *Posseld* (Miltenyi Biotec). Sólo se utilizaron las células cuando su pureza fue superior al 95%.

En los estudios de maduración por citometría se definió la población de células dendríticas como CD11c⁺ (ya purificadas en algunos ensayos) IAb⁺, mediante el marcaje con los anticuerpos anti-CD11c-*Allophycocyanin* (APC) (clon HL3) y anti-IAb-*Phycoerythrin* (PE) (clon AF6-120.1) o FITC (clon AF6-120.1). Se analizaron los marcadores de superficie CD80 (clon 16-10A1), CD86 (clon GL1), marcados con FITC, y CCR7 marcado con PE (clon 4B12). También se estudió la expresión de IL-12 intracelular incubando las células dendríticas en placa de 96 pocillos en MC con brefeldina (1 μ l/ml; GolgiPlug;

BD Biosciences) para bloquear la secreción de proteínas. Tras 24 horas, después del marcaje de superficie IAb, se fijaron y permeabilizaron con *Cytofix* *Cytoperm* (BD Biosciences) para realizar el marcaje intracelular con un anticuerpo anti-IL-12-PE (clon C15.6).

También se midió la expresión de RNAm para diferentes genes (4-1BBL, CD70, OX40L, IL-15 e IL15R), siguiendo el procedimiento que se explica en el apartado 1.1 y los cebadores de la tabla M2.

5. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

5.1. Inmunizaciones

La inmunización se llevó a cabo siguiendo distintos protocolos según la estrategia de vacunación:

5.1.1. Combinación de antígeno y adyuvantes

Se administró a los ratones diferentes combinaciones de los siguientes adyuvantes: poly (I:C) (50 µg/ratón), anti-CD40 (50 µg/ratón), oligos CpG 1826 (secuencia TCCATGACGTTCTGATGCT) (50 µg/ratón) (Sigma), EDA (con o sin antígeno) (2 nmol/ratón), todos por vía subcutánea (s.c.) en un volumen final de 100 µl/ratón diluido en PBS. Posteriormente, a los ratones previamente afeitados, se les aplicaba Imiquimod (Aldara™ 5%; 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN) con una espátula, en la zona dorsal donde se había administrado el antígeno y/o adyuvantes. Se aplicó en forma de crema (2,5 mg/ratón). Como antígeno, además de aquellos que estaban unidos a EDA, mencionados anteriormente, también se utilizó la proteína OVA (100 - 500 µg/ratón).

5.1.2. Bloqueo de IL-10

Se bloqueó la citoquina IL-10 con péptidos inhibidores de IL-10: P9 (CHRCFHFRRHHPVAVF) y P13 (TRHRHVPRFLPLRHV), sintetizados también por NeoMPS. Los péptidos se administraron vía intraperitoneal (*i.p.*), 100 µg/ratón de cada uno de ellos diluidos en PBS, en una o dos administraciones diarias.

También se utilizaron anticuerpos bloqueantes del receptor de IL-10 (α IL-10R; clon 1B1.3A), así como su isotipo control (Rat IgG1 (HRPN)), ambos de Bioxcell (West Lebanon, NH, EE.UU). Se administraron vía *i.p.* (500 μ g/ratón) diluidos en PBS.

5.2. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la respuesta inmunitaria inducida

5.2.1. Aislamiento de células linfoides

Entre 1 y 15 días después de la última inmunización, se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazo y/o nódulos linfáticos. A continuación, estos órganos se homogeneizaron con la base del émbolo de una jeringa o utilizando 2 portas esmerilados y los eritrocitos se lisaron utilizando el buffer de lisis ACK (2 ml/bazo) durante 1 minuto. Tras un lavado con RPMI 1640, las células se resuspendieron en MC y se utilizaron en los diferentes ensayos que se citan a continuación.

5.2.2. Inmunidad adaptativa: Respuesta de Linfocitos T

5.2.2.1. Producción de citoquinas

Para analizar las respuestas mediadas por LT se estudió principalmente la producción de la citoquina IFN- γ (por ser representativa de una respuesta celular de perfil Th1), reestimulando células linfoides con péptidos DTc para detectar las respuestas mediadas por LTc CD8 y proteínas para estudiar las respuestas mediadas por LTh CD4.

La detección de citoquinas intracelulares se realizó mediante citometría de flujo. En algunos casos se estudiaron únicamente las células CD8 productoras de IFN- γ , y en otros casos la producción simultánea de IFN- γ , IL-2 y TNF- α . Para ello, en placas de 96 pocillos se estimularon con el péptido OVA(257-264) (1 μ g/ml) 1×10^6 células obtenidas de los órganos linfoides de los ratones inmunizados. El cultivo se hizo a 37 °C en MC que contenía brefeldina (1 μ l/ml total de GolgiPlug; BD Biosciences) y monensina (1 μ l/ml

total de GolgiStop; BD Pharmingen), para bloquear la secreción de proteínas. Tras 4 - 5 horas, las células se marcaron con el anticuerpo anti-CD8-FITC (clon 53-6.7). Se fijaron y permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm para posteriormente realizar un marcaje intracelular con los anticuerpos anti-IFN γ -PE (clon XMG 1.2), anti-IL-2- allophycocyanin (APC) (clon JES6-5H4) y anti-TNF- α PE-CyTM 7 (clon MP6-XT22).

La frecuencia de células productoras de IFN- γ también se midió mediante un ensayo de ELISPOT utilizando un kit comercial (BD-Biosciences). Las placas (Multiscreen HTS, Millipore) se incubaron con el anticuerpo purificado anti-IFN- γ (5 μ g/ml) durante 16 horas a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con MC durante 2 horas y a continuación se añadieron las células linfoides, que se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ en MC en ausencia o presencia de proteína, de péptido o de células tumorales previamente irradiadas con 20.000 rads. Las células tumorales se incubaron con las células linfoides en una proporción 1:10 (células tumorales:células de bazo o de nódulo linfático) y fueron previamente estimuladas con IFN- γ como se describe en el apartado 1.2. Un día después, las placas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo biotinilado anti-IFN- γ (2 μ g/ml). Tras 2 horas, se lavaron y se incubaron con una dilución 1:100 de estreptavidina-peroxidasa. Una hora más tarde, se lavaron las placas y se revelaron con el sustrato AEC (BD Biosciences). La reacción colorimétrica se paró con agua destilada y el número de puntos se cuantificó utilizando un contador de ELISPOT (CTL, Aalen, Alemania).

También se cuantificaron mediante ELISA las citoquinas producidas en los sobrenadantes de cultivo. Para ello, se cultivaron 8×10^5 células linfoides en MC en ausencia o presencia de péptidos a diferentes concentraciones. Tras 48 horas, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la cantidad de IFN- γ producido mediante un ensayo de ELISA comercial (OptEIA ELISA Set, BD Biosciences), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los resultados se calcularon utilizando una curva estándar de concentraciones conocidas de IFN- γ .

5.2.2.2. Actividad lítica

5.2.2.2.a. Ensayos de lisis *in vivo*

Los ensayos de lisis *in vivo* (*in vivo killing*) consistieron en la inyección de esplenocitos de ratones no inmunizados (que llevan o no el antígeno de interés) a ratones previamente inmunizados, para posteriormente analizar su permanencia en el animal, proporcional al grado de lisis. Para ello, se extrajeron esplenocitos de ratones singénicos sin inmunizar y se incubó la mitad de los esplenocitos con el antígeno (DTc OVA(257-264) (10 µg/ml)) durante 30 minutos a 37 °C, mientras que la otra mitad se incubó en las mismas condiciones, pero sin DTc. Posteriormente se marcaron los esplenocitos, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con las siguientes concentraciones de CFSE (Invitrogen): 2,5 µM en el caso de los esplenocitos incubados con DTc y 0,25 µM en el caso de los incubados sin DTc.

A continuación, a los ratones inmunizados se les administró por vía intravenosa (*i.v.*) 1×10^7 esplenocitos marcados en una proporción 1:1. A las 16 horas se sacrificaron los ratones, se extrajeron los bazo y se homogeneizaron como se ha descrito en el apartado 5.2.1. Los esplenocitos de cada uno de los ratones se analizaron por citometría de flujo para cuantificar la lisis de aquellos esplenocitos pulsados con el DTc. Así, a mayor eficacia de la inmunización, habría una mayor lisis de los esplenocitos marcados con 2,5 µM CFSE y el DTc. Sin embargo, los esplenocitos marcados únicamente con 0,25 µM CFSE, no se lizarían. Como control negativo, se usaron ratones a los que también se les inyectó la mezcla de esplenocitos marcados, pero que previamente no habían sido inmunizados, por lo que no se debería observar lisis en ninguna de las dos poblaciones celulares. El porcentaje de lisis específica se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LISIS ESPECÍFICA: } 100 - \frac{\frac{\% \text{ Esplenocitos CFSE alto (ratón inmunizado)}}{\% \text{ Esplenocitos CFSE bajo (ratón inmunizado)}}}{\frac{\% \text{ Esplenocitos CFSE alto (ratón no inmunizado)}}{\% \text{ Esplenocitos CFSE bajo (ratón no inmunizado)}}} \times 100$$

5.2.2.2.b. Expresión de CD107

De forma simultánea a la producción de IFN- γ se analizó por citometría de flujo la expresión de CD107. Se extrajeron células linfoides de ratones inmunizados, se incubaron en ausencia o presencia de péptido con GolgiStop, GolgiPlug y al mismo tiempo se marcaron con anticuerpos anti-CD107a-FITC (LAMP-1) (clon 1D4B) y anti-CD107b-FITC (LAMP-2) (clon ABL-93). Tras 4 – 5 horas se marcó con el anticuerpo anti-CD8- PE-CyTM 7, se fijó y permeabilizó para posteriormente realizar el marcaje intracelular con el anticuerpo anti-IFN- γ -PE.

5.2.2.3. Determinación del número de LT específicos de antígeno con tetrámeros

En las células linfoides de ratones previamente inmunizados con el antígeno OVA, se estudió el número y la avidéz de los LTc CD8 por citometría de flujo marcando con una dilución 1:1000 de Tetrámeros específicos OVA(257-264)/H-2K^b-Streptavidin (SA)-PE (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) a la vez que se marcó con el anticuerpo anti-CD8-FITC.

5.2.3. Inmunidad innata

5.2.3.1. Células NK

Para el estudio del grado de activación de las células NK, los esplenocitos obtenidos de los ratones tratados de acuerdo a los diferentes protocolos, se marcaron con los anticuerpos anti-CD69-FITC (clon H1.2F3), anti-CD3-PE (clon

17A2) y anti-NK1.1-PE (clon PK136) o anti-NKp46-PE (clon 29A1.4). Se estudió mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD69⁺ en la población NKp46⁺ CD3⁻ o NK1.1⁺ CD3⁻.

También se midió la frecuencia de células NK productoras de IFN- γ mediante ELISPOT como en el apartado 5.2.2.1 utilizando como células diana la línea celular YAC-I (línea sensible a células NK), previamente irradiadas con 20.000 rads.

5.2.4. Células inmunosupresoras

Se analizaron en ratones con tumores B16-OVA las células Treg o las células mieloides supresoras mediante citometría de flujo. Para ello se extrajeron los nódulos linfáticos inguinales de ratones con tumores B16-OVA, que eran los drenantes al tumor. Las células Treg se analizaron con un kit comercial (eBiosciences, San Diego, CA, EE.UU.) que contenía anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC y anti-FoxP3-PE, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las células mieloides supresoras se marcaron con anticuerpos anti-CD11b-APC (clon M1/70), anti-Ly6C-FITC (clon AL-21) y anti-Ly6G-PE (clon 1A.8).

5.3. Análisis *in vivo* de la respuesta inmune antitumoral

La respuesta inmune antitumoral se estudió en experimentos *in vivo*, tanto en ensayos de protección (tratamientos realizados previamente a la inoculación del tumor), como en experimentos terapéuticos (tratamientos realizados en ratones con tumores establecidos).

5.3.1. Inmunidad profiláctica

Para estudiar la capacidad protectora de la respuesta inmunitaria antitumoral inducida mediante una estrategia de vacunación, se inmunizaron ratones C57BL/6 vía *i.v.* en la cola con poly (I:C) (50 μ g/ratón), anti-CD40 (50 μ g/ratón) y OVA (500 μ g/ratón). Como control se utilizaron ratones tratados con

PBS. Seis días después de la inmunización, tras ser anestesiados con isoflurano (Nicholas Piramidal, Londres, Gran Bretaña), los ratones fueron inoculados con 10^5 células tumorales B16-OVA por vía intradérmica (*i.d.*) en la zona dorsal previamente afeitada y desinfectada. Las células tumorales se resuspendieron en PBS y se administraron en un volumen de 100 μ l/ratón. El seguimiento del crecimiento tumoral se monitorizó con un calibre. El tamaño tumoral medio se expresó en centímetros cúbicos usando la fórmula $Volumen = (\text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2) / 2$. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un diámetro superior a 16 mm.

5.3.2. Inmunidad terapéutica

Para los experimentos de tratamiento en tumores ya establecidos, los ratones C57BL/6 recibieron 10^5 células tumorales B16-OVA o B16-F10 por vía *i.d.*. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 mm, (unos 8 - 10 días tras la inoculación de las células), comenzaron los tratamientos con las diferentes estrategias, que tuvieron una duración de 20 días.

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

- **Combinación de antígeno y adyuvantes:** Se realizaron diferentes protocolos de tratamiento que consistieron en la administración de diferentes combinaciones de adyuvantes y antígeno. La inmunoterapia consistió en la administración de poly (I:C) (50 μ g/ratón), anti-CD40 (50 μ g/ratón), OVA (100 - 500 μ g/ratón) o EDA-Antígeno (2 nmol/ratón), todos por vía intratumoral (*i.t.*) en un volumen final de 100 μ l/ratón diluido en PBS. Posteriormente se aplicaba el Imiquimod en crema (2,5 mg/ratón), con una espátula en la zona del tumor donde se administraba el antígeno y/o adyuvantes.
- **Bloqueo de citoquinas inmunosupresoras:** Para el bloqueo de las citoquinas inmunosupresoras TGF- β e IL-10 se emplearon los péptidos inhibidores de TGF- β : P17 (KRIWFIPRSSWYERA) y P144 (TSLDASIIWAMMQN), el péptido inhibidor de IL-10 P9 (apartado 5.1.2) y

anticuerpos bloqueantes de ambas citoquinas. Los péptidos inhibidores de TGF- β se administraron cada dos días y en el caso del péptido inhibidor de IL-10 P9 se administró diariamente. Los anticuerpos se administraron por vía *i.p.* una vez por semana en el caso de IL-10R (500 μ g/ratón) y dos veces a la semana en el caso de TGF- β (clon 1D11.16.8, Bioxcell; 200 μ g/ratón) (en un volumen de 200 μ l/ratón diluido en PBS).

5.4. Extracción de tumores y análisis

Se extirparon los tumores B16-OVA de ratones tratados con los diferentes tratamientos del apartado 5.3.2, utilizando un bisturí estéril (Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra), para analizar diferentes parámetros en ellos. Además, se utilizaron ratones con tumores sin tratar como grupo control.

5.4.1. Expresión de RNAm OVA en tumores tratados

Los tumores se homogeneizaron con la base del émbolo de una jeringa y se pasaron por un separador de células de 100 μ m (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ EE.UU.) diluido en PBS. A continuación se centrifugaron las células y el pélet se trató como en el apartado 1.1 para medir la expresión del RNAm de OVA.

5.4.2. Niveles de citoquinas intratumorales

Los tumores se homogeneizaron con un tampón RIPA (150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40 (IGEPAL CA630), 0,5% DOC (deoxicolato sódico)) junto a inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania), y se incubó a 4 °C durante 15 minutos. A continuación se agitaron las muestras y se centrifugaron para recoger los sobrenadantes y medir las citoquinas mediante ELISA. La cuantificación de citoquinas se normalizó con respecto a los niveles de proteína total, calculados mediante el reactivo de Bradford (Azul de Coomassie G-250, Pierce Chem. EE.UU.), utilizando una curva estándar con BSA.

5.4.3. Análisis por citometría de flujo

Los tumores homogeneizados, como en el apartado 5.4.1, se incubaron con el anticuerpo Fc Block™ durante 30 minutos y posteriormente se marcaron con anticuerpos específicos para analizar las células Treg (apartado 5.2.4) y la expresión de péptido asociado a latencia (LAP) del TGF- β con el anticuerpo anti-LAP-PE (clon 27232) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.)

5.5. Ensayos de depleción *in vivo* de células NK y linfocitos CD8

Para comprobar la implicación de la inmunidad innata y adaptativa en el efecto antitumoral inducido por una estrategia de inmunoterapia se deplecionaron las población de células NK o linfocitos CD8. La depleción se llevó a cabo mediante la administración de anticuerpos anti-NK1.1 (clon PK-136) (Bioxcell) y anticuerpos anti-CD8 (obtenidos a partir del líquido ascítico como se describe en el apartado 4.1, con sus respectivos isotipos como controles. Se administraron 200 μ g/ratón de anticuerpo diluido en PBS en un volumen final de 200 μ l/ratón por vía *i.p.* los días -1, 0, 2, 4 y 6, siendo el día 0 cuando comienza el tratamiento.

6. ESTADÍSTICA

La normalidad de los datos obtenidos se estudió con un test Shapiro-Wilk. Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron utilizando test paramétricos (t de Student y ANOVA de una vía) y no paramétricos (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney). La supervivencia de los ratones en los experimentos de tumor se analizó mediante el método Kaplan-Meier y el test log-rank. Se consideraron diferencias significativas aquellos valores de p inferiores a 0,05. En las gráficas se representan la media aritmética de las diferentes réplicas \pm el error estándar de la media. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa SPSS v.013 para Windows y el programa GraphPad Prism 5.03.

RESULTADOS

1. INMUNOTERAPIA BASADA EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA EN UN MODELO TUMORAL POCO INMUNOGÉNICO

1.1. Modelo tumoral de melanoma B16-OVA

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Llopiz *et al.* 2008) se demostró que una simple administración profiláctica del adyuvante agonista de TLR3 poly (I:C) y anticuerpos agonistas anti-CD40 (α CD40), junto con el antígeno OVA, inducía una potente respuesta de células T. Esta respuesta protegía al 100% de los ratones del crecimiento de tumores subcutáneos del timoma EG7-OVA. Sin embargo, cuando este mismo protocolo profiláctico se aplicó en un modelo tumoral de melanoma, B16-OVA, no se apreciaron diferencias en los tamaños tumorales ni en la supervivencia entre los ratones vacunados y los controles no vacunados (**Figura R1**).

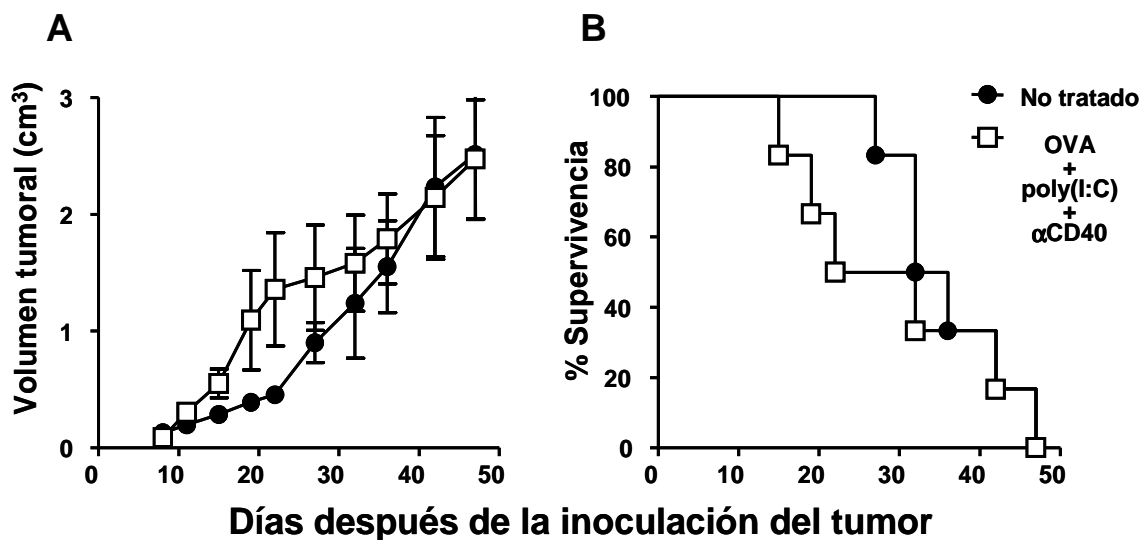


Figura R1. La inmunización con OVA + poly (I:C) + anti-CD40 no protege a los ratones frente al desarrollo de tumores B16-OVA. Ratones C57BL/6 ($n=6$ /grupo) se inmunizaron por vía *i.v.* con OVA + poly (I:C) + anti-CD40 o se trataron con PBS como grupo control. Seis días después se inocularon 10^5 células tumorales B16-OVA por vía *i.d.* El crecimiento tumoral se monitorizó cada 3 - 4 días. La gráfica representa el volumen tumoral de los grupos de animales estudiados (**A**) y la supervivencia (**B**).

Estos resultados sugerían la escasa inmunogenicidad de las células tumorales B16-OVA en comparación con las células EG7-OVA. La baja inmunogenicidad podría estar determinada por algunas características propias de las células tumorales, como son la baja expresión de antígeno y de MHC-I. Ensayos de RT-PCR que analizaban la expresión de OVA (**Figura R2A**), y de citometría de flujo que estudiaban la expresión de MHC-I (**Figura R2B**), confirmaron esta hipótesis. Por lo tanto, las células tumorales B16-OVA se convertían en un buen modelo para desarrollar estrategias de inmunoterapia con aplicaciones potencialmente clínicas.

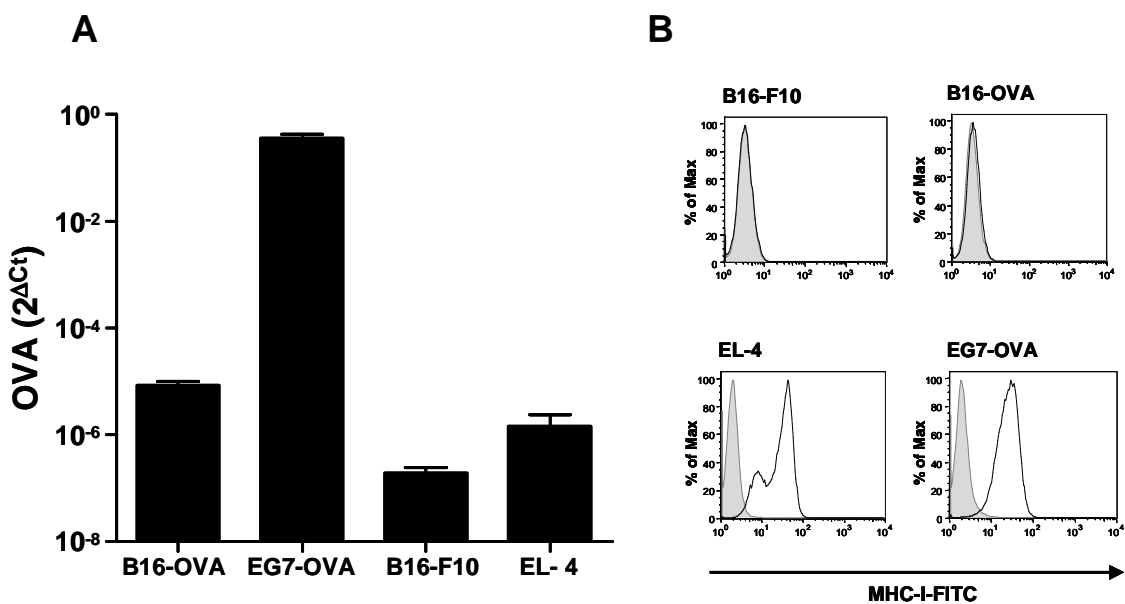


Figura R2. Expresión del RNAm de OVA y moléculas de MHC-I en células tumorales. Se extrajo el RNA de células B16-OVA y EG7-OVA utilizando como controles las células sin transfectar B16-F10 y EL-4 respectivamente. Se midió la expresión del RNAm de OVA para las distintas líneas celulares mediante RT-PCR en tiempo real (**A**). Las mismas líneas celulares se marcaron con anticuerpos anti-H-2K^b-FITC para medir la expresión de MHC-I (**B**).

1.2. Inmunoterapia con adyuvantes: Un agonista de TLR más anticuerpos agonistas de CD40

Teniendo como referencia los resultados obtenidos en el modelo EG7-OVA, donde la administración intratumoral del adyuvante agonista de TLR3 poly (I:C), más anticuerpos anti-CD40 rechazaban el 35% de los tumores

establecidos (Llopiz *et al.* 2008), quisimos comprobar la eficacia terapéutica de la combinación de un ligando de TLR y anti-CD40 en tumores B16-OVA. A diferencia del tratamiento en EG7-OVA, en este caso se empleó otro agonista de TLR, el adyuvante Imiquimod en crema, un ligando de TLR7 que ha sido utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento en pacientes con melanoma (Shackleton *et al.* 2004; Turza *et al.* 2010; Narayan *et al.* 2012).

1.2.1. Tratamiento de ratones con tumor

Para estudiar el efecto terapéutico de esta inmunoterapia, se procedió a un tratamiento tumoral. Para ello, cuando el tumor alcanzó unos 5 mm de diámetro, se administró tres veces por semana la combinación de Imiquimod y anti-CD40 durante un periodo de 20 días.

Como se muestra en la **Figura R4**, la administración repetida de estos adyuvantes produjo un retraso significativo ($p < 0,05$) en el crecimiento de los tumores. Sin embargo, a pesar de este retraso, ningún animal consiguió rechazar el tumor y todos fueron sacrificados el día 40, tras el inicio del tratamiento.

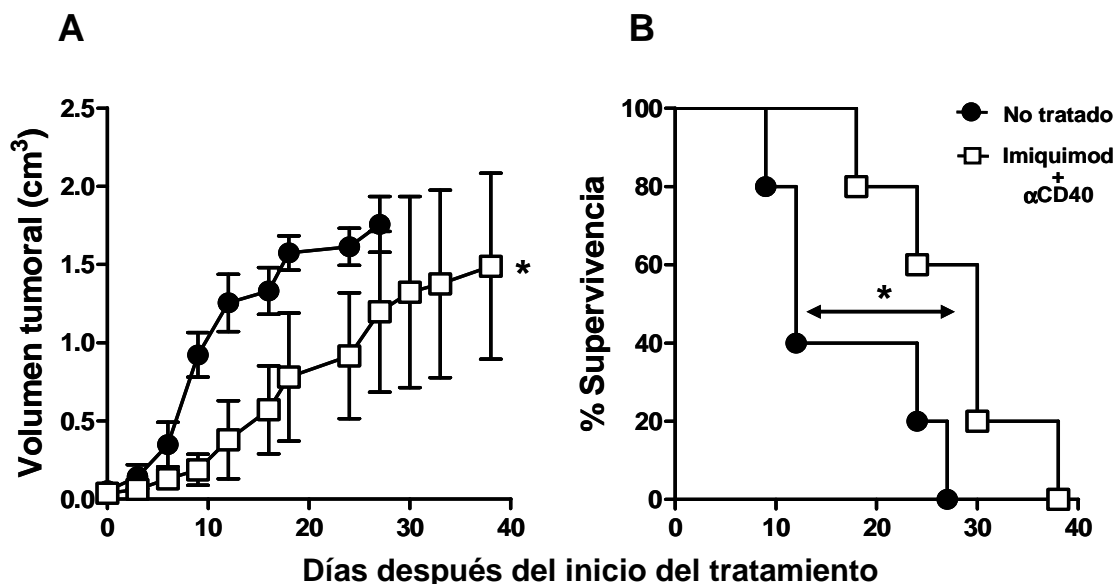


Figura R4. La inmunoterapia basada en la administración de adyuvantes Imiquimod y anti-CD40 tiene un pobre efecto antitumoral. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=5$ /grupo). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones se trataron 3 veces por semana durante un periodo de 20 días con Imiquimod + anti-CD40 (50 μ g/ratón (*i.t.*)), y se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (**A**) y la supervivencia (**B**). *, $p < 0,05$.

El rechazo de los tumores en el modelo EG7-OVA después de la administración de poly (I:C) más anticuerpos anti-CD40, estaba asociado a la inducción de la respuesta innata y adaptativa. Por ello, se estudiaron las respuestas que inducía la inmunoterapia basada en Imiquimod más anticuerpos anti-CD40 en el modelo B16-OVA.

1.2.2. Inducción de la respuesta inmunitaria innata

Para estudiar la activación de la inmunidad innata, se analizaron las funciones de células NK y CD tras la administración de los adyuvantes a ratones *naïve*. A las 24 horas de la administración se observó en el bazo una alta actividad de las células NK (**Figura R5A**), tanto al analizar la expresión del marcador de activación CD69 como la producción de IFN- γ . También se mostró una mayor maduración de las CD (**Figura R5B**), utilizando para ello el análisis de la expresión de CD86. Estos datos demostraron que la inmunidad innata se activaba cuando se administraban los adyuvantes Imiquimod más anti-CD40.

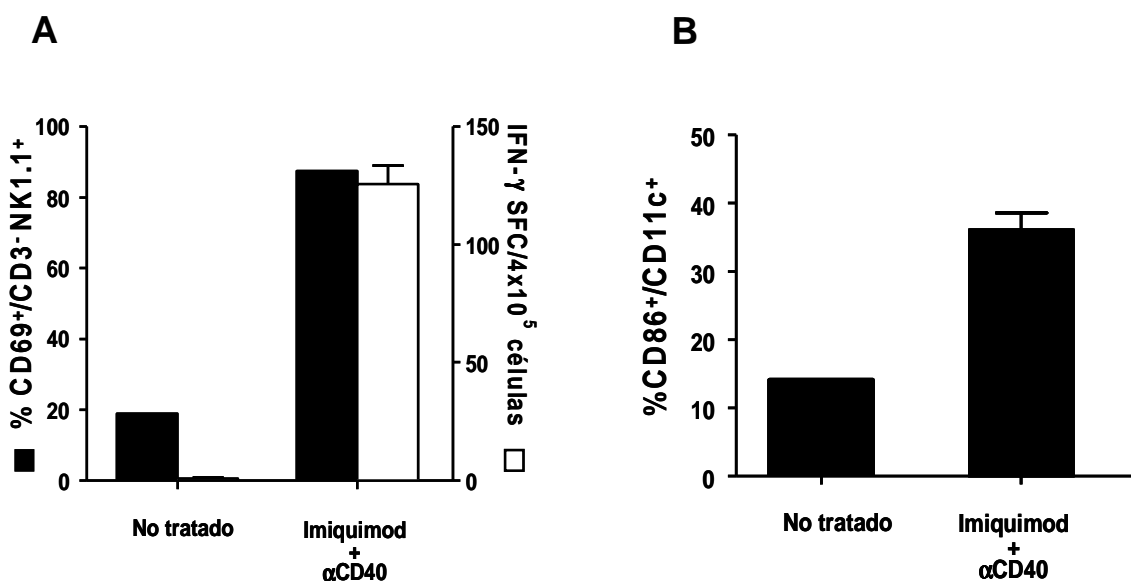


Figura R5. Los adyuvantes Imiquimod + anti-CD40 activan la inmunidad innata. Ratones *naïve* C57BL/6 ($n=3$) recibieron Imiquimod + anti-CD40. A las 24 horas los esplenocitos se marcaron con anticuerpos anti-CD69-FITC, anti-CD3-APC, anti-NK1.1-PE, y se analizó el número de células NK activas (barras negras), caracterizadas como CD69⁺ dentro de la población CD3⁻ NK1.1⁺. También se analizaron las células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT estimulando a los esplenocitos con la línea celular NK-sensible YAC-I (barras blancas) (A). La activación de las CD se analizó midiendo el porcentaje de células CD86⁺ en la población CD11c⁺ (B).

1.2.3. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta adaptativa se estudió administrando Imiquimod y anti-CD40 a ratones con tumores B16-OVA, puesto que en ausencia de antígeno exógeno, sería el propio tumor el que potencialmente aportaría los antígenos frente a los que se induciría la respuesta. Se cuantificó el número de células productoras de IFN- γ frente al antígeno tumoral OVA (respuesta CD4) y el péptido OVA(257-264) (DTc inmunodominante reconocido por los LTc CD8 específicos de OVA). Los resultados obtenidos (**Figura R6**) mostraron que la inmunoterapia combinada de Imiquimod más anti-CD40, administrada a ratones con tumores B16-OVA, no era capaz de activar la inmunidad adaptativa.

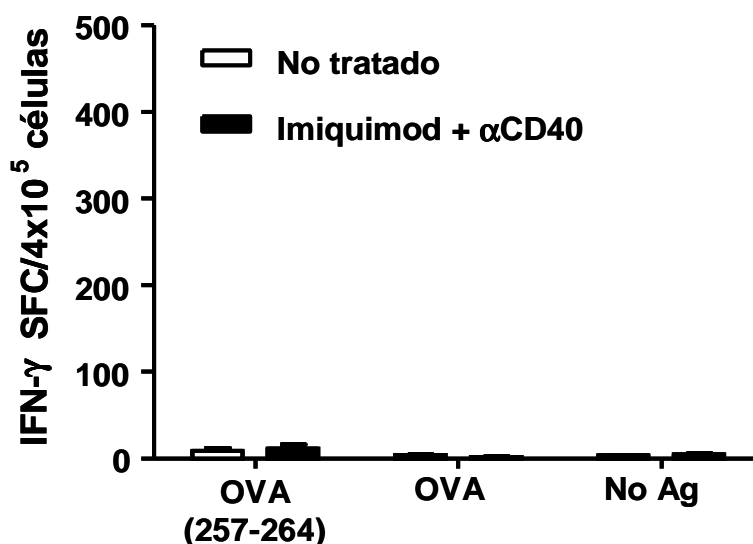


Figura R6. El tratamiento con los adyuvantes Imiquimod + anti-CD40 en ratones con tumores B16-OVA no induce inmunidad adaptativa. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=3$). Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 mm (día 0) se trataron los ratones con Imiquimod + anti-CD40 los días 0 y 4. Siete días después del comienzo del tratamiento se sacrificaron los ratones para medir la respuesta adaptativa frente a la proteína OVA y el péptido OVA(257-264) mediante un ELISPOT que analiza la producción de IFN- γ . Se utilizó un grupo no tratado como control.

Estos resultados concordaban con el escaso efecto antitumoral de esta inmunoterapia, ya que sólo fue capaz de activar la inmunidad innata.

1.3. Inmunoterapia con adyuvantes más antígeno tumoral exógeno

En los ratones con tumores B16-OVA tratados únicamente con adyuvantes, no se mostró actividad en la inmunidad adaptativa. Puesto que en los ratones con tumores EG7-OVA, la inclusión de OVA aumentaba la eficacia antitumoral de poly (I:C) y anti-CD40, de un 35% a un 100% de supervivencia (Llopiz *et al.* 2008), decidimos incluir antígeno exógeno en la inmunoterapia frente a B16-OVA, y de este modo poder inducir respuestas adaptativas capaces de rechazar el tumor.

Se inmunizaron ratones sin tumor con OVA + Imiquimod + anti-CD40, para estudiar la capacidad de este protocolo de activar la inmunidad adaptativa. Se utilizó como control positivo la inmunoterapia previamente utilizada en el modelo EG7-OVA. Las respuestas inducidas por OVA junto con la combinación Imiquimod + anti-CD40 mostraron una fuerte sinergia, de un modo similar a la obtenida al combinar poly (I:C) y anti-CD40 (Figura R7).

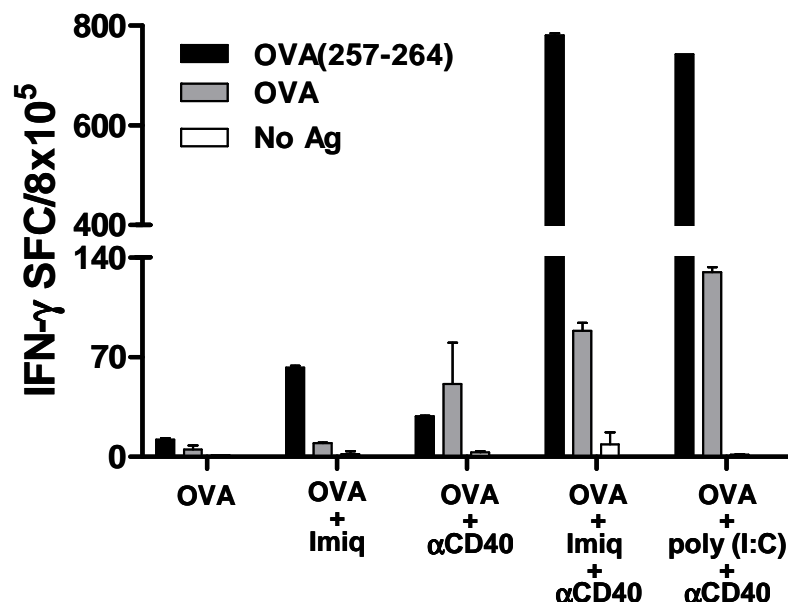


Figura R7. La inmunización con OVA más la combinación de adyuvantes Imiquimod + anti-CD40 tiene un efecto sinérgico en la inducción de respuestas adaptativas frente al antígeno tumoral OVA. Se inmunizaron ratones *naïve* C57BL/6 ($n=3/\text{grupo}$) con OVA + las diferentes combinaciones de adyuvantes. El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con antígenos de OVA. La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT.

1.3.1. Tratamiento de ratones con tumor

Puesto que los adyuvantes Imiquimod y anti-CD40 activaban la inmunidad innata, y en combinación con la proteína OVA inducían linfocitos específicos de antígenos del tumor, quisimos comprobar si esta combinación mejoraba los efectos antitumorales en B16-OVA con respecto al protocolo basado en la administración de adyuvantes sin antígeno. Para ello, se administraron 3 dosis por semana de OVA y anti-CD40 junto con administraciones diarias de la crema Imiquimod, todo ello durante un periodo de 20 días. Se introdujo este cambio en la administración del adyuvante Imiquimod porque en ratones *naïve* hallamos que incrementando el número de administraciones, se aumentaban las respuestas adaptativas (**Figura R8**).

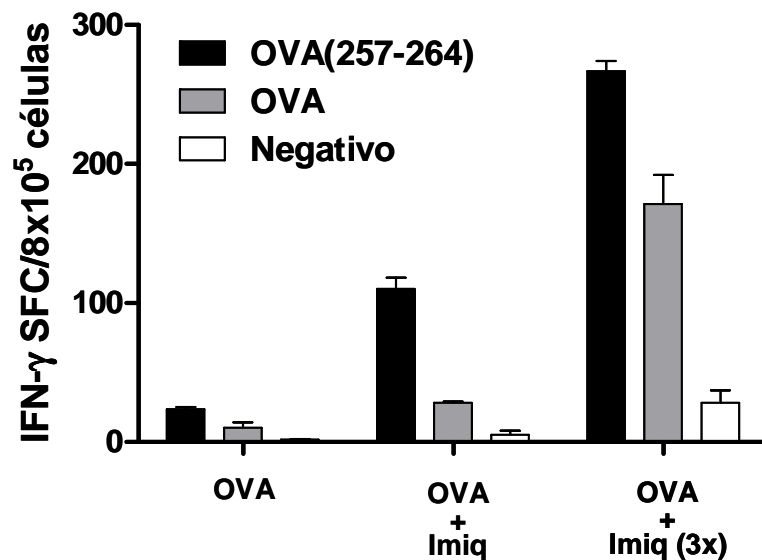


Figura R8. El número de administraciones de Imiquimod es un factor importante para aumentar la respuesta. Se inmunizaron ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 2/grupo$) con OVA + Imiquimod. Un grupo recibió una administración de Imiquimod (día 0) y otro grupo tres administraciones (días 0,1 y 2). El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con antígenos de OVA. La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT.

Durante el periodo de tratamiento en el que se administró OVA + Imiquimod + anti-CD40 se observó un potente efecto antitumoral, que controló el crecimiento del tumor de una forma latente o más reducida. Este crecimiento controlado perduró unos 10 días tras la finalización del tratamiento (**Figura**

R10A). Por otro lado, se observó que cuando finalizó el tratamiento, la supervivencia de los ratones no tratados fue del 33%, mientras que en el grupo tratado fue del 100% (**Figura R10B**). Aun así, la inmunoterapia seguía siendo insuficiente ya que finalmente ninguno de los ratones consiguió rechazar el tumor y todos fueron sacrificados el día 40.

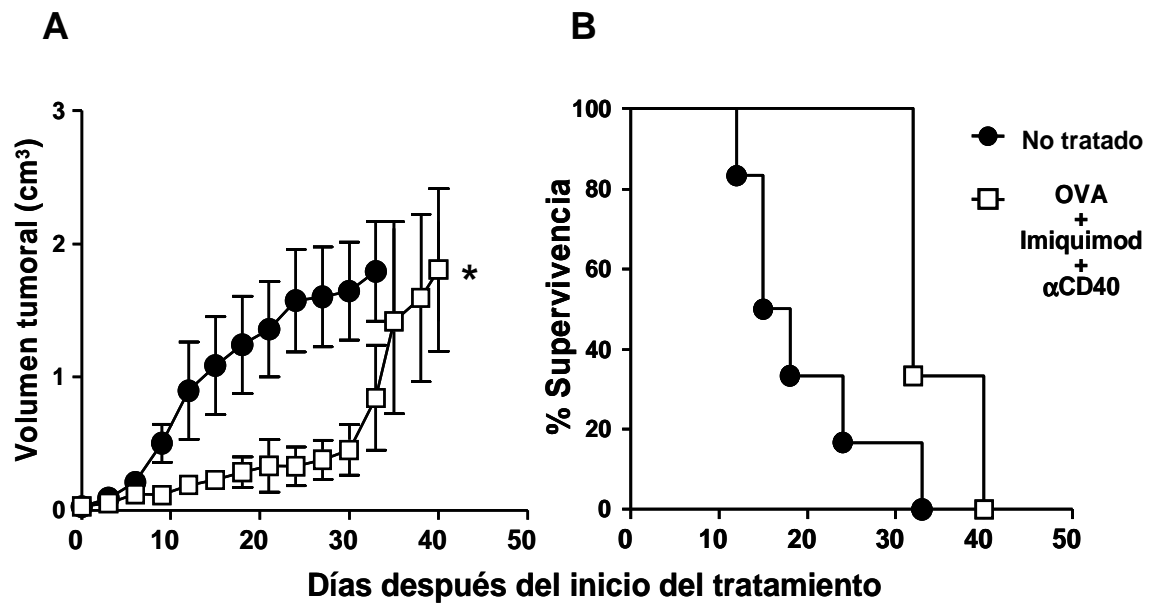


Figura R10. El tratamiento OVA + Imiquimod + anti-CD40 mejora los efectos antitumorales. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n= 6/grupo$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados 3 veces por semana durante un periodo de 20 días con OVA (100 μ g/ratón) + anti-CD40 (50 μ g/ratón), por vía *i.t.*. Además, el Imiquimod se administró todos los días sobre el tumor. Se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (A) y la supervivencia (B). *, $p < 0,05$.

Puesto que el efecto antitumoral de OVA + poly (I:C) + anti-CD40 en el modelo EG7-OVA era claramente mejor que el obtenido con OVA + Imiquimod + anti-CD40 en el modelo de B16-OVA, se analizó si la diferencia era debida a la utilización de una combinación diferente de adyuvantes. Para ello se trataron ratones con tumores B16-OVA con ambas combinaciones. Como muestra la **Figura R11**, la combinación OVA + poly (I:C) + anti-CD40 también indujo un retraso en el crecimiento tumoral, pero tampoco consiguió rechazar los tumores, obteniéndose resultados similares.

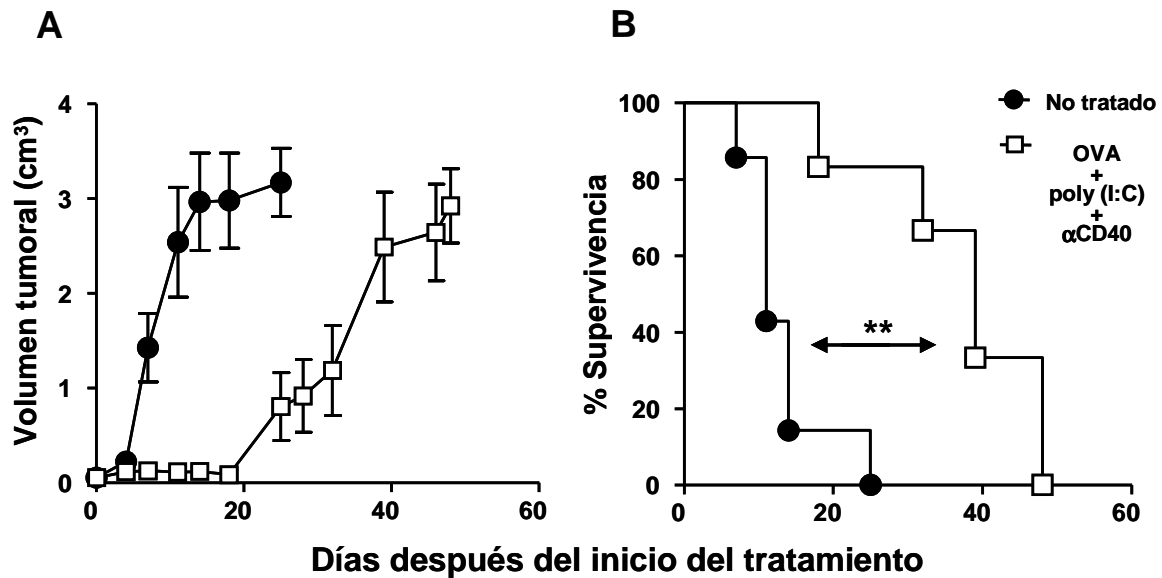


Figura R11. La administración de OVA + poly (I:C) + anti-CD40 tiene efectos antitumorales similares a OVA + Imiquimod + anti-CD40 en tumores B16-OVA. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n= 6-7$ /grupo) Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados 3 veces por semana durante un periodo de 20 días con OVA (100 μ g/ratón) + poly (I:C) (50 μ g/ratón) + anti-CD40 (50 μ g/ratón), por vía *i.t.*. Se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (A) y la supervivencia (B). **, $p < 0,01$.

1.3.2. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa

El tratamiento de tumores con adyuvantes más antígeno presentó un mayor efecto, aunque no se consiguió rechazar ningún tumor. Al contrario que en los protocolos basados en la administración única de adyuvantes, la ausencia de rechazo no se atribuyó a la falta de activación de LT específicos del tumor, ya que en los ratones con tumor que fueron tratados durante dos semanas se mostró activa la inmunidad adaptativa (Figura R12).

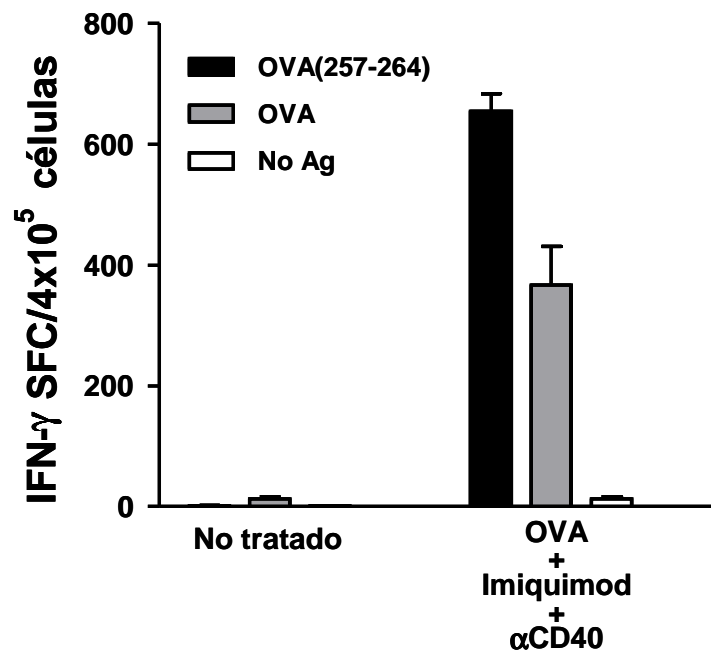


Figura R12. La inmunoterapia OVA + Imiquimod + anti-CD40 induce respuestas adaptativas en ratones con tumores B16-OVA. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=3$). Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 mm se trataron los ratones con 2 administraciones (día 0 y 4) de: OVA (100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (*i.t.*)) + Imiquimod + anti-CD40 (50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (*i.t.*)). A los siete días se sacrificaron los ratones para medir respuestas analizando la producción de IFN- γ frente a la proteína OVA y el péptido OVA(257-264) mediante un ensayo de ELISPOT. Se utilizó un grupo no tratado como control.

La estrategia de inmunoterapia que combina un antígeno tumoral con una mezcla de dos adyuvantes, produjo un retraso del crecimiento tumoral durante el periodo de tratamiento, e incluso se mantenía este efecto unos 10 días después del tratamiento. Esto indicaba que se inducían respuestas mediadas por linfocitos T, pero desafortunadamente éstas no fueron suficientemente eficaces como para rechazar los tumores.

1.4. Inmunoterapia basada en la combinación múltiple de adyuvantes y vehiculización del antígeno

El limitado, pero significativo, efecto que el tratamiento con antígeno más adyuvantes tenía en el crecimiento de los tumores, planteó la necesidad de establecer una nueva estrategia que fuera capaz de potenciar la cantidad y calidad de la respuesta adaptativa inducida, con el objetivo de alcanzar el rechazo de tumores.

Sabiendo los efectos potentes que se obtienen con las sinergias entre adyuvantes (Chen *et al.* 2009; Raman *et al.* 2010; Narayanan *et al.* 2011; Thomann *et al.* 2011), se planteó una estrategia que incluyera 3 moléculas (poly (I:C), Imiquimod y anticuerpos anti-CD40) como una combinación múltiple de adyuvantes (MAC). Además, se fusionó el antígeno tumoral OVA con la molécula EDA, que en estudios previos había demostrado que actuaba como vehículo de los antígenos a las CD, lo que mejoraba la presentación antigénica y la inducción de respuestas celulares (Lasarte *et al.* 2007; Mansilla *et al.* 2009; Mansilla *et al.* 2011; San Roman *et al.* 2012). De este modo, se activaría al sistema inmunitario por diferentes vías de señalización con el objetivo de inducir un efecto sinérgico.

1.4.1. Inducción de la respuesta inmunitaria innata

1.4.1.1. Análisis de la activación de las células dendríticas

En primer lugar se estudió el efecto *in vitro* de diferentes combinaciones de adyuvantes sobre CD derivadas de médula ósea obtenidas de ratones *naïve*. Se observó que MAC + EDA inducía altos niveles de RNAm correspondiente a moléculas co-estimuladoras que estaban asociadas con la activación de LT (**Figura R14A**), así como también citoquinas importantes para activar a las células T CD8 (**Figura R14B**).

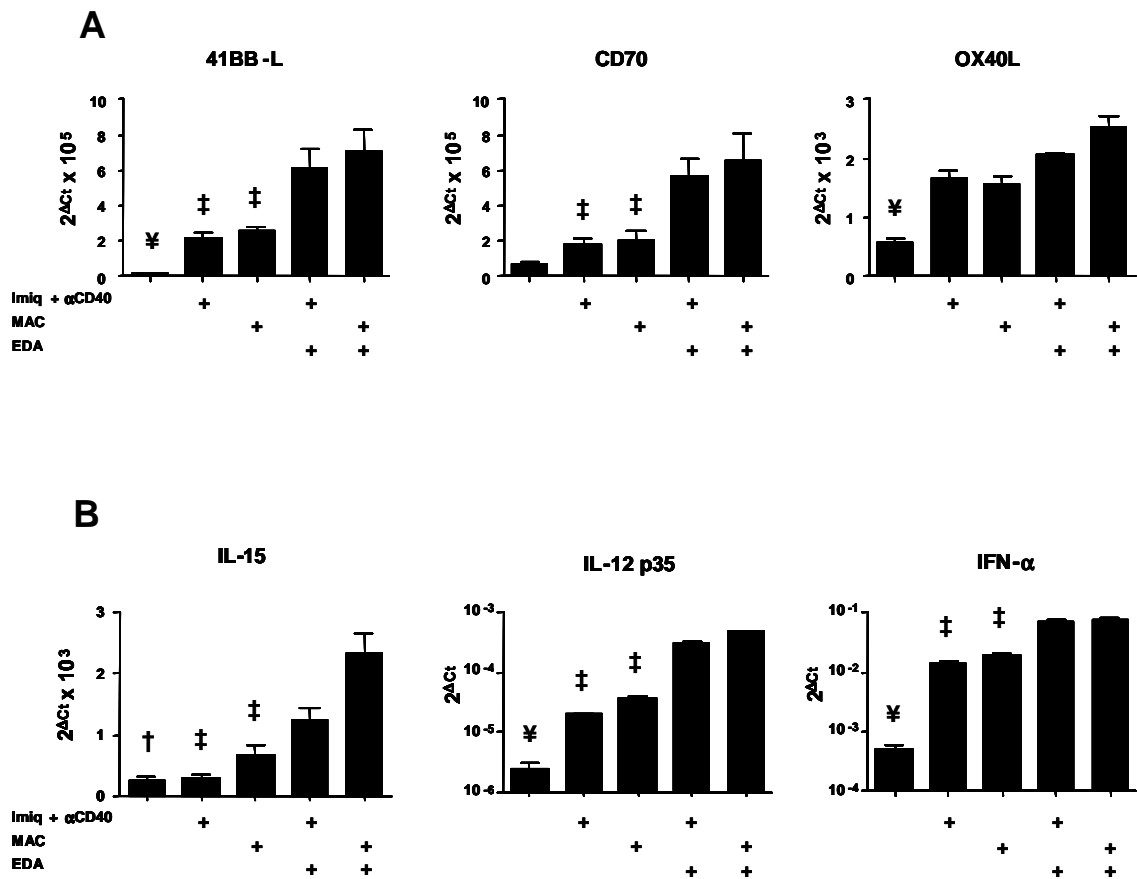


Figura R14. Una combinación múltiple de adyuvantes (MAC) + EDA aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras y de citoquinas en células dendríticas *in vitro*. Se estimularon CD *in vitro* en una placa de 96 pocillos ($n= 4$ pocillos/grupo) con: Imiquimod (5 $\mu g/ml$) + anti-CD40 (50 $\mu g/ml$), combinación múltiple de adyuvantes (MAC; Imiquimod + anti-CD40 + poly (I:C) (50 $\mu g/ml$)), EDA (2 μM) + Imiquimod + anti-CD40 o EDA + MAC durante 5 horas (A) o 24 horas (B). Después se recogieron las CD y se analizó la expresión de RNAm de diferentes moléculas mediante RT-PCR. (A) Expresión de RNAm de moléculas co-estimuladoras 4-1BBL, CD70 y OX40L. (B) Expresión de RNAm de citoquinas IL-15, IL-12 p35 y IFN- α († $p < 0,05$ NT vs resto de grupos; ‡ $p < 0,05$ Imiq + $\alpha CD40$ o MAC vs Imiq + $\alpha CD40$ + EDA ó EDA + MAC; †† $p < 0,05$ NT vs Imiq + $\alpha CD40$ + EDA o EDA + MAC).

A continuación se estudió el efecto de estas combinaciones *in vivo* en ratones con tumor. Un día después de la administración de los adyuvantes a los ratones, se extrajeron las CD de los nódulos drenantes del tumor y se

analizaron diferentes parámetros relacionados con la activación de CD. Estos experimentos mostraron que, en general, MAC, con o sin EDA, inducía altos niveles de expresión de las moléculas de co-estímulo CD80 y CD86, como también ocurría con la citoquina IL-12 y el receptor de quimioquina CCR7, lo que se relacionó con un mayor número de CD encontradas en el nódulo linfático (**Figura R15A**). Resultados equivalentes se obtuvieron en los análisis de RNAm de moléculas co-estimuladoras, IL-15 e IL15R ($p < 0,05$; *MAC o EDA+MAC vs Resto de grupos*) (**Figura R15B**).

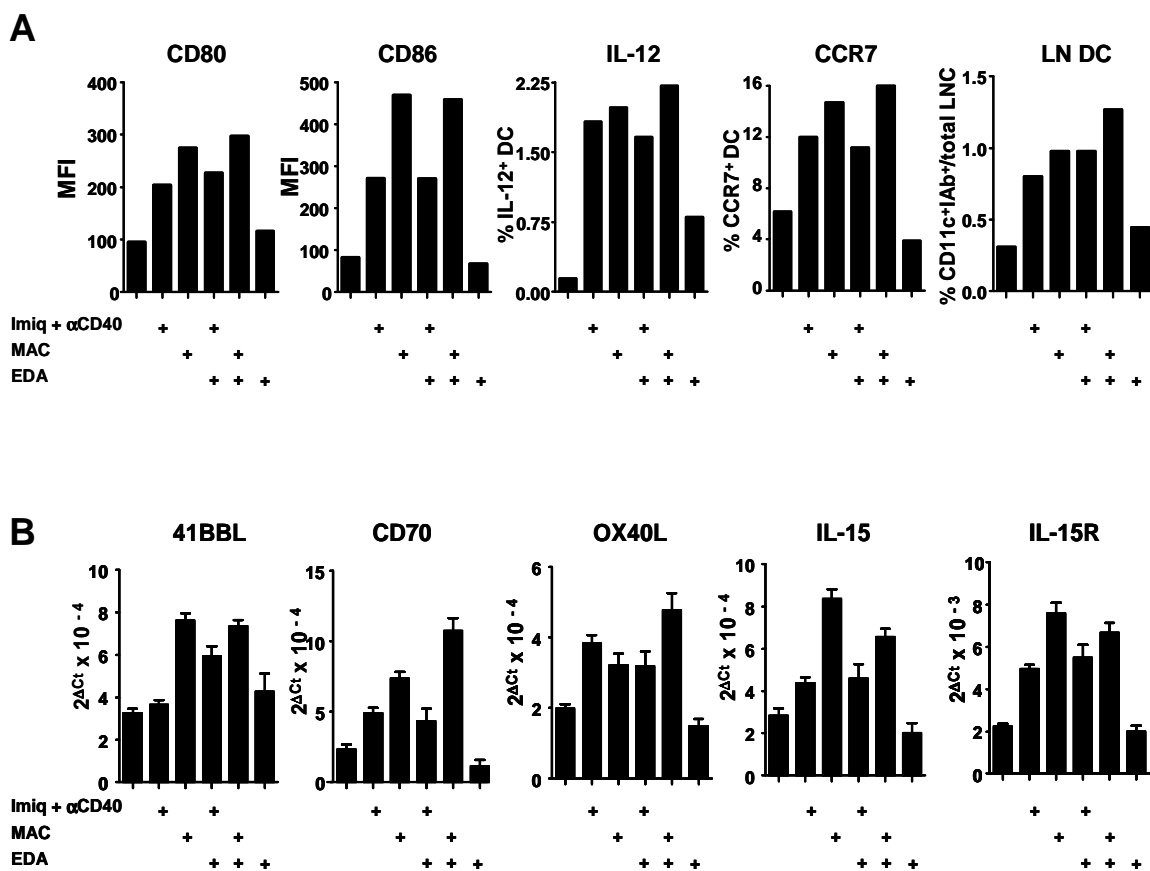


Figura R15. La administración de EDA + MAC en ratones con tumores B16-OVA potencia la activación de las CD. Se inocularon 10⁵ células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=5/grupo$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm recibieron una administración de diferentes combinaciones de adyuvantes. A las 24 horas los ratones fueron sacrificados, se extrajeron y se agruparon los ganglios linfáticos drenantes del tumor para tratarlos como una única muestra. Se estudió mediante citometría de flujo el número de CD, definidas como CD11c⁺ IAb⁺, así como la expresión de las moléculas CD80, CD86, IL- 12, CCR7 en la dicha población CD (**A**). Se analizó mediante RT- PCR la expresión de RNAm de moléculas de co-estimulo (4-1BBL, CD70, OX40L), IL-15 y IL-15R (**B**). Los resultados obtenidos son representativos de 2 experimentos independientes.

1.4.1.2. Análisis de la activación de células NK

En los análisis *ex vivo* de la activación de las células NK, tras una única administración de las diferentes combinaciones de adyuvantes a ratones *naïve*, MAC y EDA + MAC fueron las combinaciones que indujeron una mayor producción de IFN- γ ($p < 0,01$) (Figura R16).

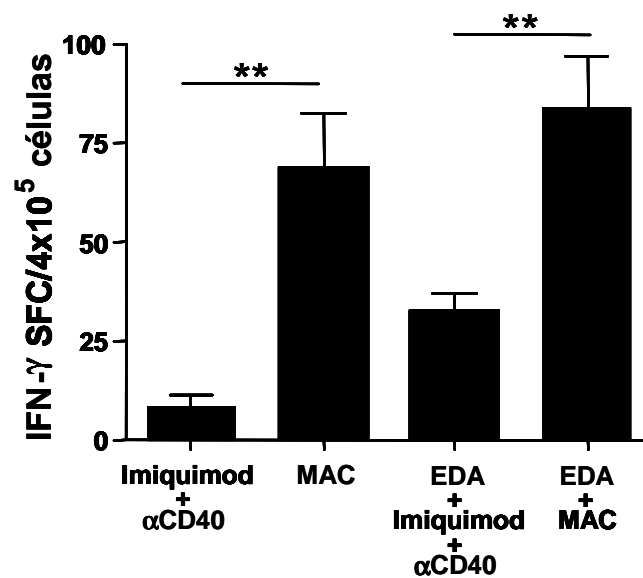


Figura R16. Efecto de la combinación de adyuvantes sobre la activación de las células NK en ratones *naïve*. Ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 3/grupo$) recibieron una administración de las diferentes combinaciones de adyuvantes. A las 24 horas los ratones fueron sacrificados y se analizó el número de células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT estimulando los esplenocitos con la línea YAC-I sensible a células NK. **, $p < 0,01$.

Cuando los adyuvantes se administraron a ratones con tumor, de nuevo MAC y EDA + MAC fueron las combinaciones más potentes para activar a las células NK en los nódulos linfáticos que drenaban al tumor, determinado tanto por el aumento en el porcentaje de células CD69⁺ (Figura R17A) como por el

número de células productoras de IFN- γ (**Figura R17B**) dentro de esta población.

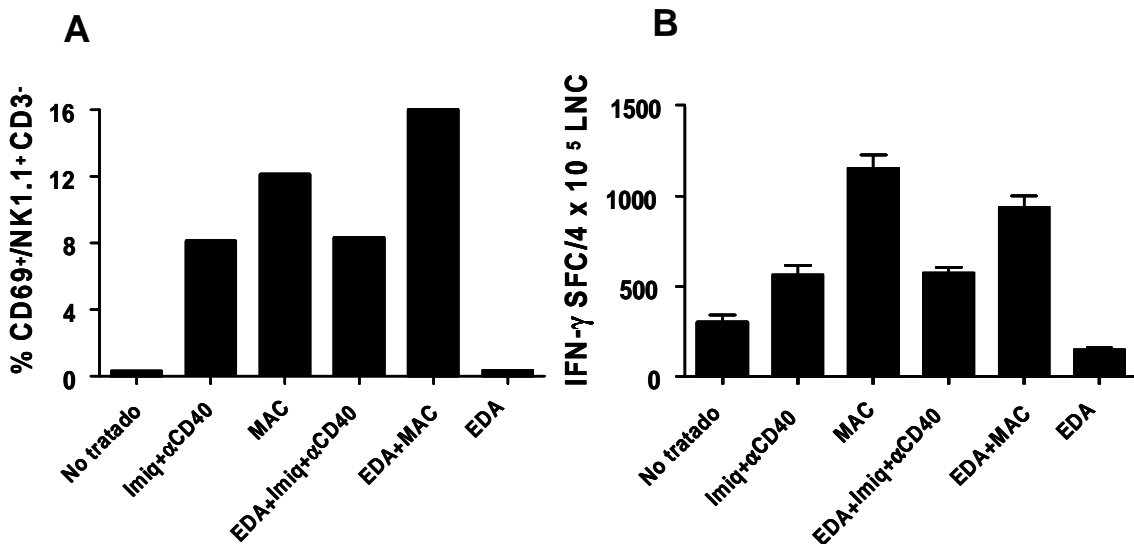


Figura R17. Efecto de la combinación de adyuvantes sobre la activación de las células NK en ratones con tumor. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=5$ /grupo). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm recibieron una administración de las diferentes combinaciones de adyuvantes. A las 24 horas los ratones fueron sacrificados, se extrajeron y se agruparon los ganglios linfáticos drenantes del tumor para tratarlos como una única muestra. Se analizó el porcentaje de células NK activas (células CD69⁺ en la población NK1.1⁺ CD3⁻) mediante citometría de flujo (**A**) y el número de células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT estimulando los esplenocitos con la línea celular NK-sensible YAC-1 ($n=5$ pocillos/grupo) (**B**). Los resultados obtenidos son representativos de 2 experimentos independientes.

1.4.2. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa

Uno de los principales mecanismos de inmunidad antitumoral es la eliminación de las células tumorales mediante los LT CD8. Las características que presentaba este modelo tumoral y los resultados obtenidos en el tratamiento con antígeno más adyuvantes, indicaban que teníamos que potenciar la inmunidad adaptativa para conseguir mejorar el efecto antitumoral. Por ello se caracterizó la respuesta adaptativa inducida por EDA-OVA + MAC.

1.4.2.1. Efectos cuantitativos

En ensayos *in vitro* se observó un aumento en la expresión de MHC-I cuando se incubaban las células B16-OVA con IFN- γ (**Figura R18**). Este hecho, junto con la dificultad de los tumores B16-OVA para ser reconocidos por los LT CD8 indican que, una inmunoterapia que fuera capaz de inducir altos niveles de IFN- γ podría facilitar el aumento de la expresión de MHC-I en las células tumorales del nicho tumoral, mejorando así la presentación antigénica a los LTc.

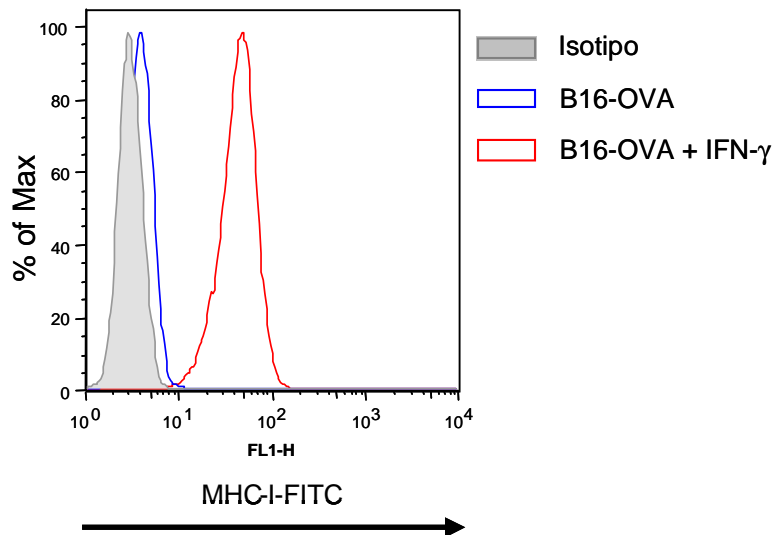


Figura R18. La estimulación con IFN- γ aumenta la expresión de MHC-I en las células B16-OVA *in vitro*. Células B16-OVA se estimularon con 500 U/ml de IFN- γ durante 48 horas y la expresión de MHC-I se estudió por citometría de flujo tras marcar las células con anticuerpos anti-H2K^b-FITC.

Los análisis de la inmunidad adaptativa en ratones *naïve* inmunizados con las diferentes combinaciones, mostraban (**Figura R19**) que EDA-OVA + MAC inducía un mayor número de células productoras de IFN- γ , con un potente efecto sinérgico, comparado con las inmunizaciones con OVA más triple o doble combinación de adyuvantes ($p < 0,01$; EDA-OVA + MAC vs Resto de grupos).

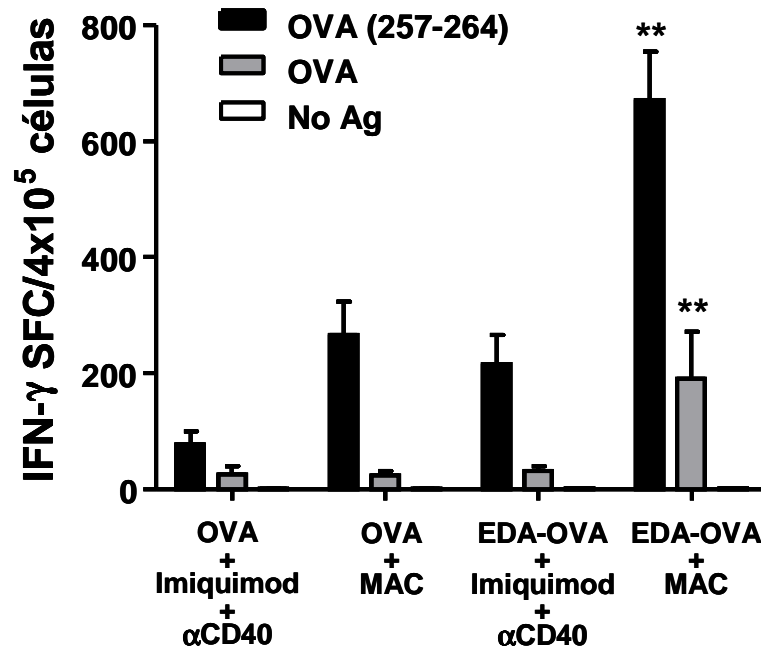


Figura R19. EDA-OVA + MAC induce una respuesta adaptativa más potente. Ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 3/grupo$) recibieron una administración de diferentes combinaciones de adyuvantes. Siete días después se sacrificaron los ratones para medir la respuesta frente a antígenos de OVA analizando la producción de IFN- γ mediante ELISPOT. **, $p < 0,01$ EDA-OVA + MAC vs Resto de grupos.

La proteína EDA puede tener un efecto inflamatorio por su capacidad de activar a las CD, así como un efecto de vehículo cuando se encuentra fusionada al antígeno. Para analizar cuáles eran sus efectos en nuestro modelo, se inmunizaron ratones *naïve* con MAC + OVA, o MAC + OVA fusionada o separada de EDA. Se observó que los mejores resultados se obtenían cuando OVA estaba fusionada a EDA, ya que EDA libre no aportaba apenas beneficio sobre el grupo OVA + MAC (**Figura R20**). Estos resultados sugieren que en estas condiciones, el principal efecto de EDA es ejercer un papel de vehículo del antígeno para mejorar la presentación antigénica.

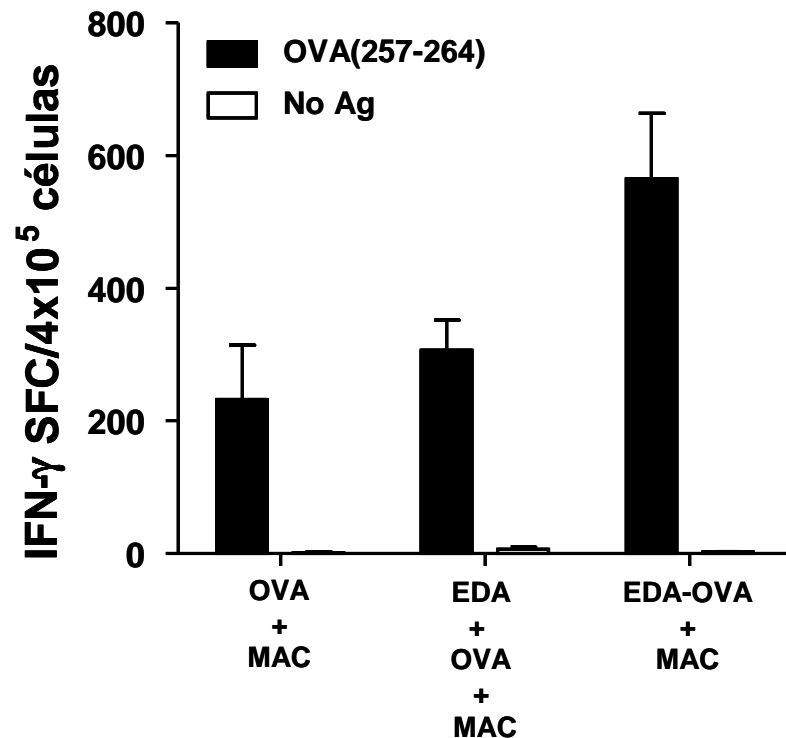


Figura R20. La conjugación de OVA a EDA aumenta la respuesta CD8. Ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 3/grupo$) recibieron una administración de OVA + MAC, EDA + OVA + MAC o EDA-OVA + MAC. Siete días después se sacrificaron los ratones para medir la respuesta frente al péptido OVA(257-264) analizando la producción de IFN- γ mediante ELISPOT.

1.4.2.2. Efectos cualitativos

Aparte de mejorar la magnitud de la respuesta con la nueva inmunoterapia planteada, quisimos saber si también se potenciaban las diferentes cualidades de los LT activados, que permitieran mejorar los efectos antitumorales.

Uno de los aspectos importantes que se estudió fue la avidéz. Tal y como se mostró en la **Figura R2** del apartado 1.1, este modelo tumoral expresa poco antígeno, por lo tanto los linfocitos están limitados en el reconocimiento de estas células. Este aspecto indica que es necesario desarrollar un tratamiento capaz de inducir linfocitos de alta avidéz. De este modo, tras la inmunización,

se determinó la avidéz de los LTc específicos de OVA(257-264) mediante su estimulación con concentraciones decrecientes del péptido. Los resultados indicaron (**Figura R21**) que al contrario del resto de los grupos, los linfocitos de los ratones inmunizados con EDA-OVA + MAC, producían altas cantidades de IFN- γ al estimularlos con altas concentraciones de OVA(257-264), y además todavía producían IFN- γ cuando se estimulaban con bajas concentraciones de antígeno (del orden de 0,1 a 1 ng/mL).

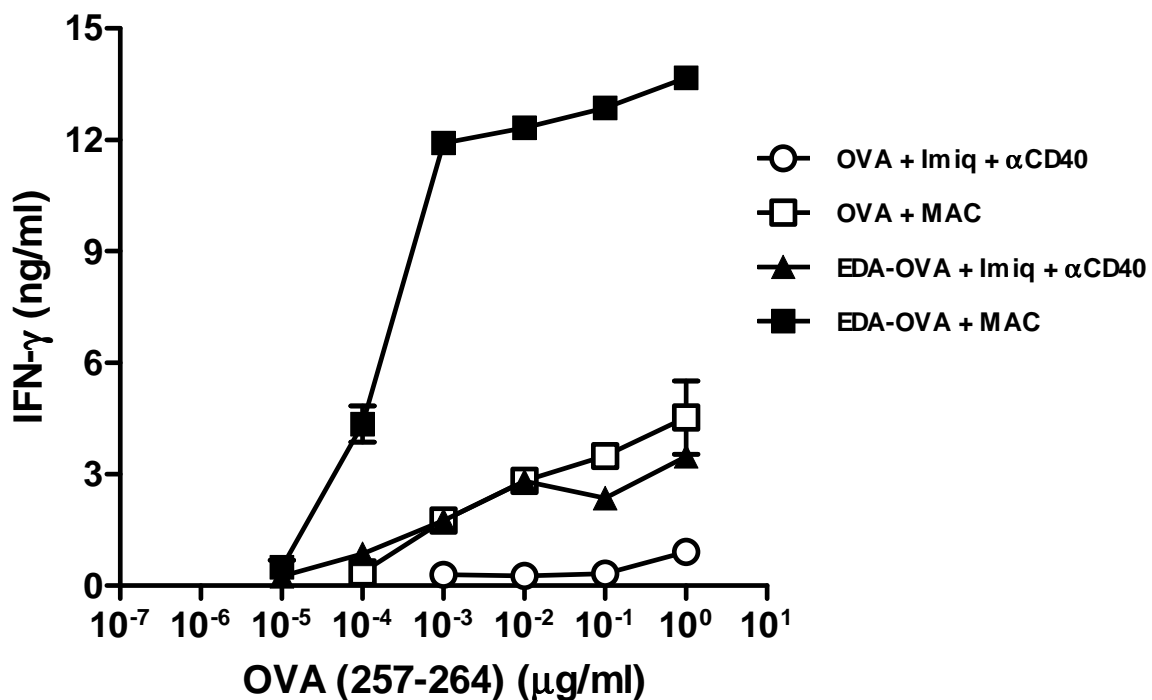


Figura R21. La inmunización con EDA-OVA + MAC activa linfocitos capaces de producir más cantidad de IFN- γ a concentraciones altas y bajas de antígeno. Los esplenocitos de los ratones utilizados en la **Figura R19** se estimularon con diferentes concentraciones de OVA(257-264). A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IFN- γ mediante ELISA.

Estos altos niveles de IFN- γ no sólo se debieron a una mayor expansión de LT específicos de OVA(257-264) de alta afinidad, tal y como se observa al realizar un marcaje con concentraciones bajas de tetrámeros OVA(257-264)/K^b, sino también al aumento de la activación de células productoras de IFN- γ (**Figura R22**), estudiado al utilizar concentraciones de péptido de 0,1 ng/mL.

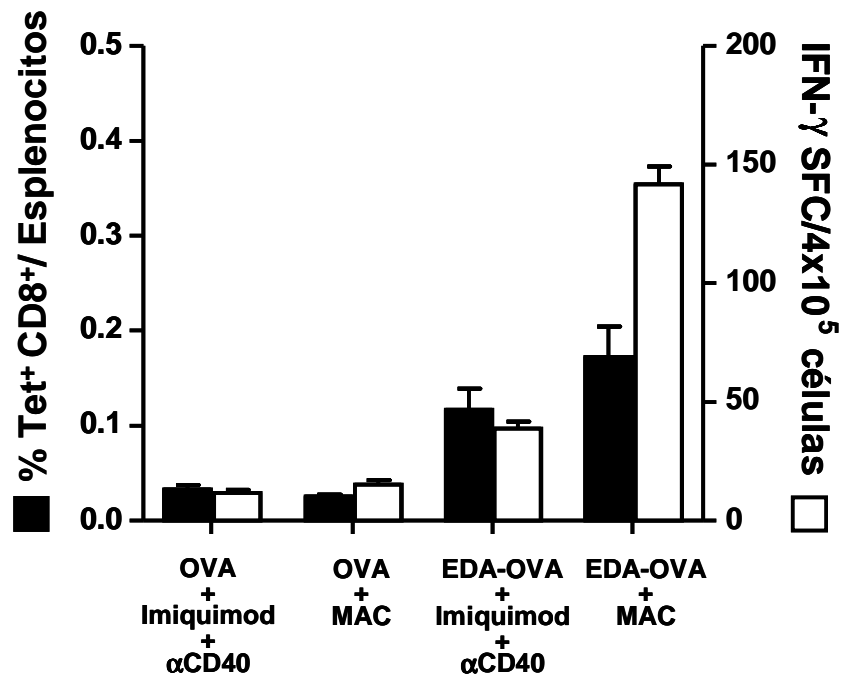


Figura R22. La inmunización EDA-OVA + MAC induce linfocitos CD8 de alta avidéz. Ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 3/grupo$) recibieron una administración de las diferentes combinaciones de adyuvantes. Siete días después se sacrificaron los ratones para analizar el porcentaje de linfocitos OVA(257-264)/K^b Tetrámero⁺ (dilución del Tetrámero 1:1000) representado con barras negras y el número de células productoras de IFN- γ (concentración 0,1 ng/mL de OVA(257-264)), representado con barras blancas, mediante ELISPOT.

Otra cualidad que se quiso estudiar fue la polifuncionalidad de los LTc inducidos, ya que varios autores han demostrado que los linfocitos capaces de realizar múltiples funciones son más eficaces en su acción antitumoral (Imai *et al.* 2009). Dos de los parámetros que se estudiaron fueron la producción simultánea de varias citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y la capacidad lítica determinada por la expresión de CD107. Los resultados mostraron que la inmunización con EDA-OVA + MAC era la combinación que inducía mayor porcentaje de LT CD8 productores de las tres citoquinas (barras blancas) y CD107/IFN- γ (barras negras) (**Figura R23**).

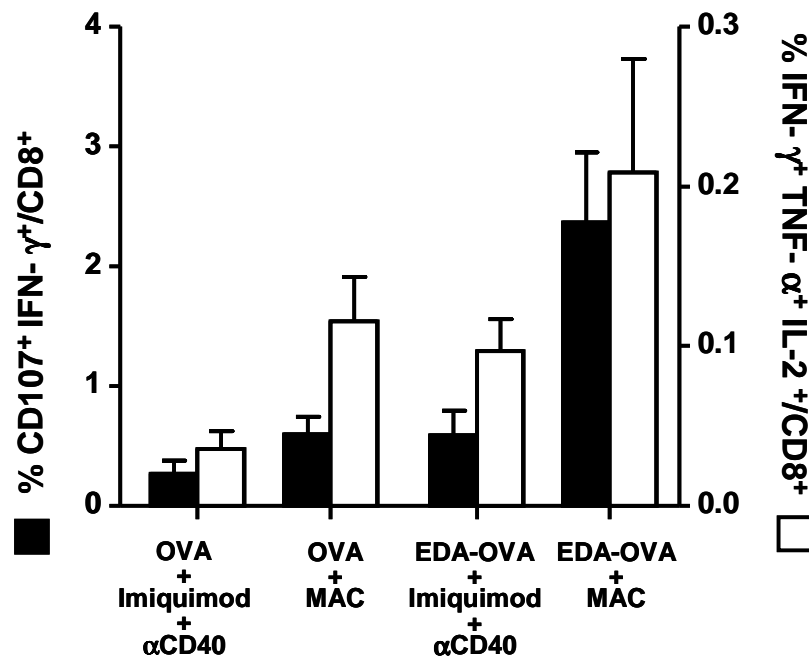


Figura R23. La inmunización con EDA-OVA + MAC induce linfocitos CD8 multifuncionales. Ratones C57BL/6 ($n= 3/grupo$) recibieron una administración de las diferentes combinaciones de adyuvantes. Siete días después se sacrificaron los ratones para medir mediante citometría de flujo la expresión simultánea de IFN- γ /TNF- α /IL-2 (barras blancas) o CD107/IFN- γ (barras negras) en los LT CD8 tras la estimulación antigénica con el péptido OVA(257-264).

1.4.2.3. Inmunidad antitumoral

Después de analizar los efectos cuantitativos y cualitativos sobre los LT de la inmunoterapia EDA-OVA + MAC en ratones *naïve*, se estudió la capacidad de inducir respuestas frente a las células tumorales. Para ello en un primer ensayo se trataron ratones con tumores B16-OVA durante un periodo de 10 días con las diferentes combinaciones de inmunoterapia y se midió la respuesta frente a los tumores. Los animales tratados con la combinación de EDA-OVA + MAC eran los que presentaron un menor tamaño tumoral (**Figura R24A**) y 12 días tras el comienzo del tratamiento el 50% de los ratones habían rechazado el tumor (**Figura R24B**).

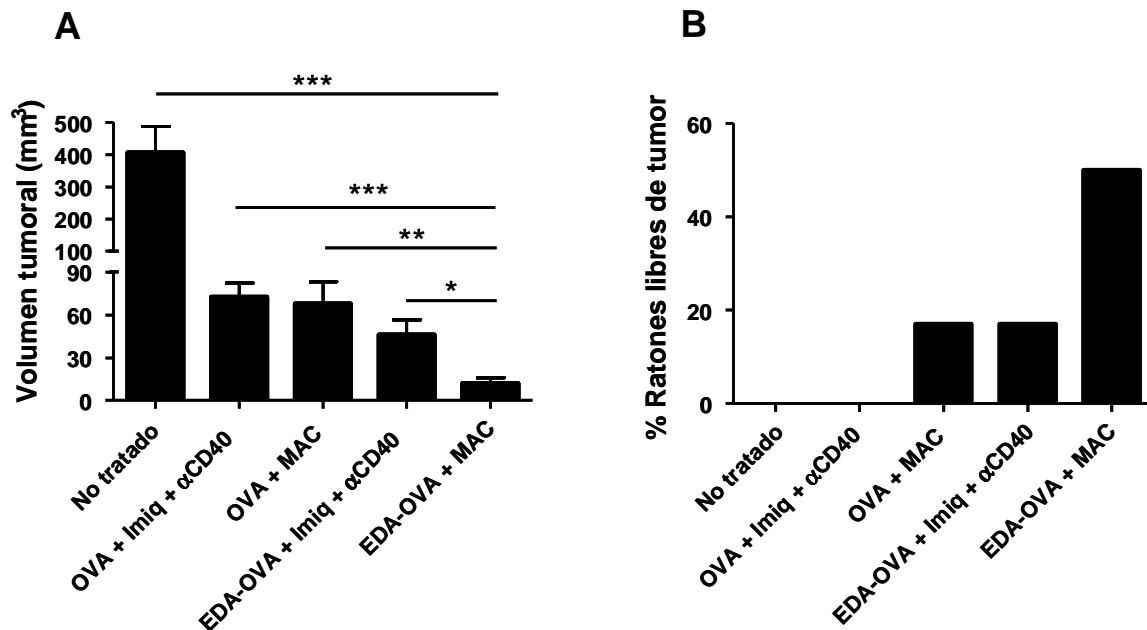


Figura R24. Efectos antitumorales de las diferentes combinaciones de adyuvantes. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=12/grupo$). Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 mm se trataron los ratones con las diferentes combinaciones de adyuvantes durante un periodo de 10 días. La gráfica representa el volumen tumoral de los grupos de animales estudiados (A) y el porcentaje de ratones libres de tumor a día 12 (B). Se utilizó un grupo no tratado como control. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

Estos resultados estaban de acuerdo con los resultados hallados al analizar la capacidad de los linfocitos de reconocer a las células tumorales B16-OVA, donde los ratones tratados con EDA-OVA + MAC junto con OVA + MAC, presentaron los valores más altos. Además se obtuvieron resultados equivalentes al analizar el reconocimiento de las células tumorales B16-F10 (Figura R25).

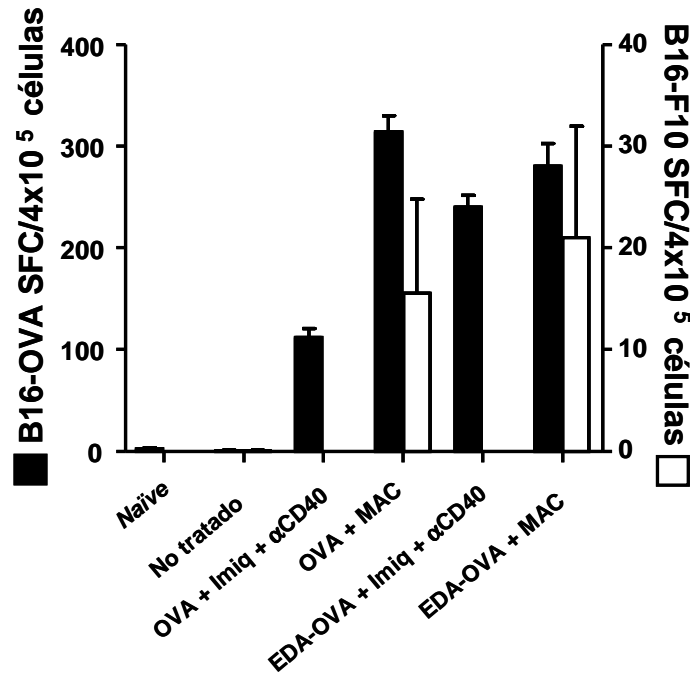


Figura R25. Reconocimiento de células tumorales *in vitro*. Esplenocitos obtenidos de ratones *naïve* C57BL/6 o de ratones con tumores B16-OVA sin tratar o tratados con los diferentes adyuvantes durante 2 semanas ($n=6/\text{grupo}$), fueron estimulados *in vitro* con células tumorales B16-OVA o B16-F10 previamente incubadas con IFN- γ e irradiadas. La respuesta se midió analizando la producción de IFN- γ mediante ELISPOT.

Para descartar que la eficacia de los diferentes tratamientos no estuviera relacionada con la pérdida de expresión de OVA, ésta se analizó en las líneas celulares y en los tumores no tratados o tratados con diferentes combinaciones. No se encontraron diferencias en la expresión de OVA entre los diferentes grupos (**Figura R26**).

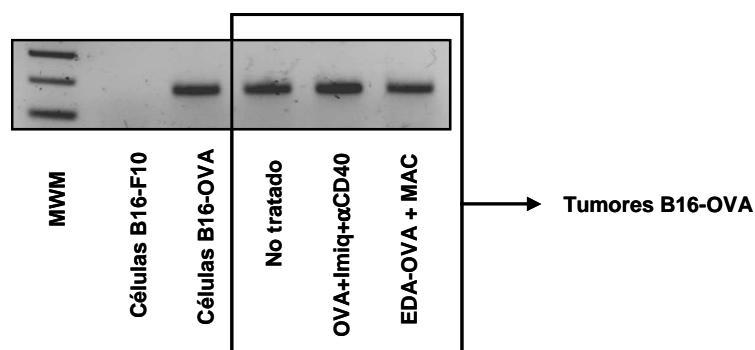


Figura R26. Expresión del RNAm de OVA en los tumores B16-OVA tratados. Se midió la expresión del RNAm de OVA en los tumores de los ratones de la **Figura R25** mediante RT-PCR. Como controles se utilizaron las líneas celulares.

1.4.2.4. Tratamiento de ratones con tumor

Una vez establecido que la mejor combinación de adyuvantes para activar la inmunidad innata y adaptativa era EDA-OVA + MAC, se procedió a ver su eficacia en el modelo de ratones con tumor, analizando el crecimiento tumoral, capacidad de rechazo y supervivencia. El tratamiento de los ratones con tumor siguió el mismo protocolo de administración que el mostrado en la **Figura R9**.

Los experimentos mostraron que este tratamiento, administrado durante tres semanas a ratones con tumores B16-OVA, inhibía totalmente el crecimiento tumoral durante los primeros 30 días, mientras que todos los ratones no tratados habían sido sacrificados alrededor del día 28 ($p < 0,01$) (**Figura R27A**). Cuarenta días tras el comienzo del tratamiento en algunos ratones curados empezó a crecer el tumor, pero finalmente, el 50% consiguió rechazar el tumor definitivamente (**Figura R27B**).

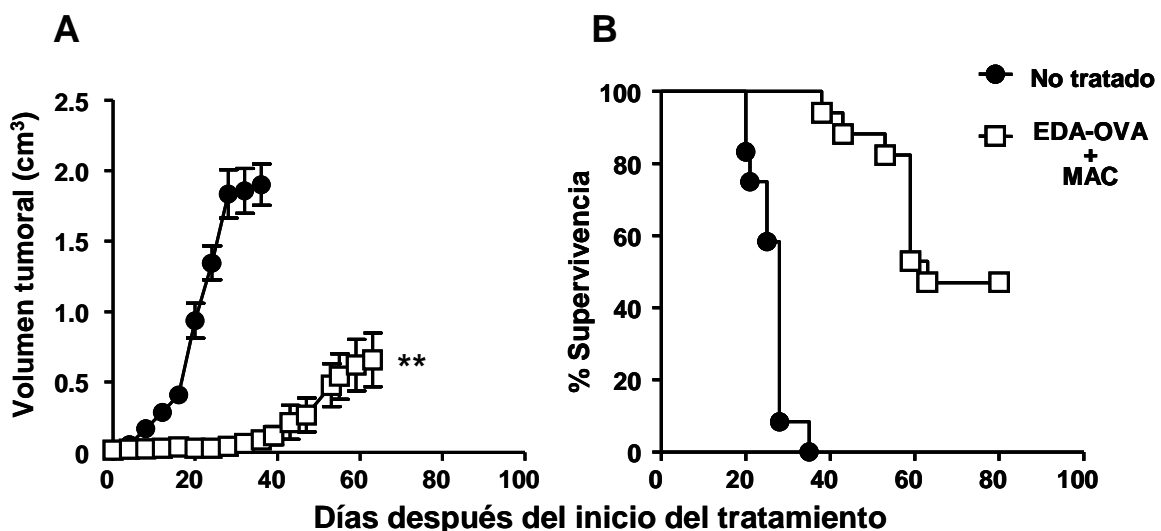


Figura R27. El tratamiento EDA-OVA + MAC rechaza un 50% de tumores B16-OVA establecidos. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n = 14-17/\text{grupo}$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días con EDA-OVA + MAC. Se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (**A**) y la supervivencia (**B**). **, $p < 0,01$.

Se comprobó que el efecto antitumoral de la inmunoterapia era óptimo cuando el tratamiento era local, ya que con un tratamiento distal al tumor, por vía subcutánea, no se mantenía dicho efecto, y así los tumores crecían una vez finalizado el tratamiento y todos los ratones fueron sacrificados el día 38 (Figura R28 A y B).

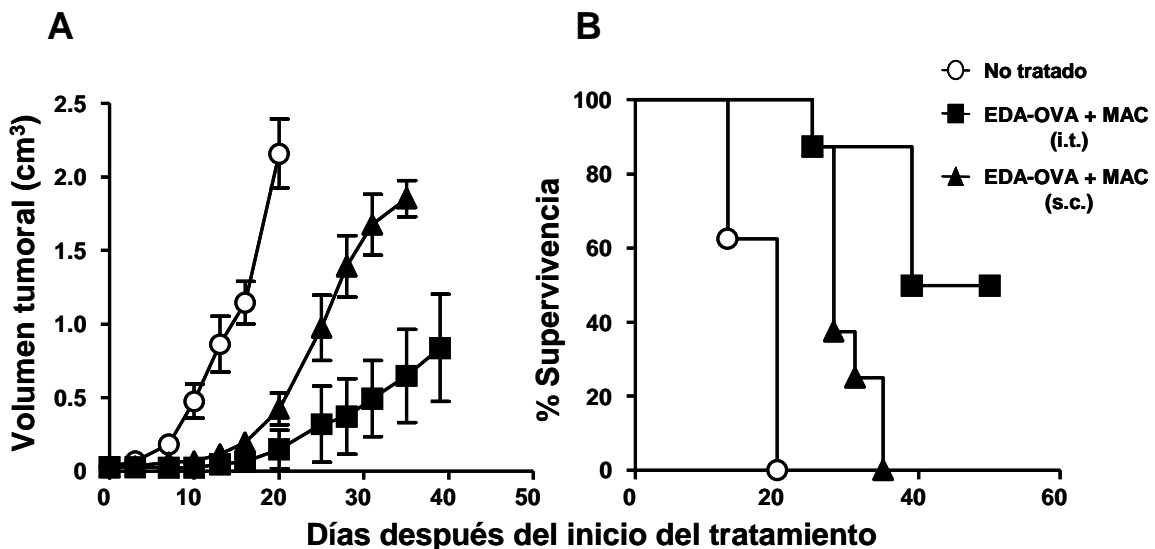


Figura R28. El efecto antitumoral de EDA-OVA + MAC requiere la administración local. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n= 14-17/grupo$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días con EDA-OVA + MAC, un grupo por vía *i.t.* y otro por vía *s.c.*. Se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (A) y la supervivencia (B).

La relevancia en el rechazo de tumores de las poblaciones efectoras inducidas con el tratamiento EDA-OVA + MAC se estudió mediante la depleción de células CD8 y de células NK en ratones con tumor, previamente al inicio del tratamiento. Estos experimentos mostraron la importancia que tenían los LT CD8 inducidos por la inmunoterapia EDA-OVA + MAC sobre el efecto antitumoral (Figura R29A) ($p < 0,01$; ratones deplecionados de CD8 vs Isotipo, en supervivencia (Figura R29B)). De la misma manera, se comprobó la implicación, aunque menor, de las células NK.

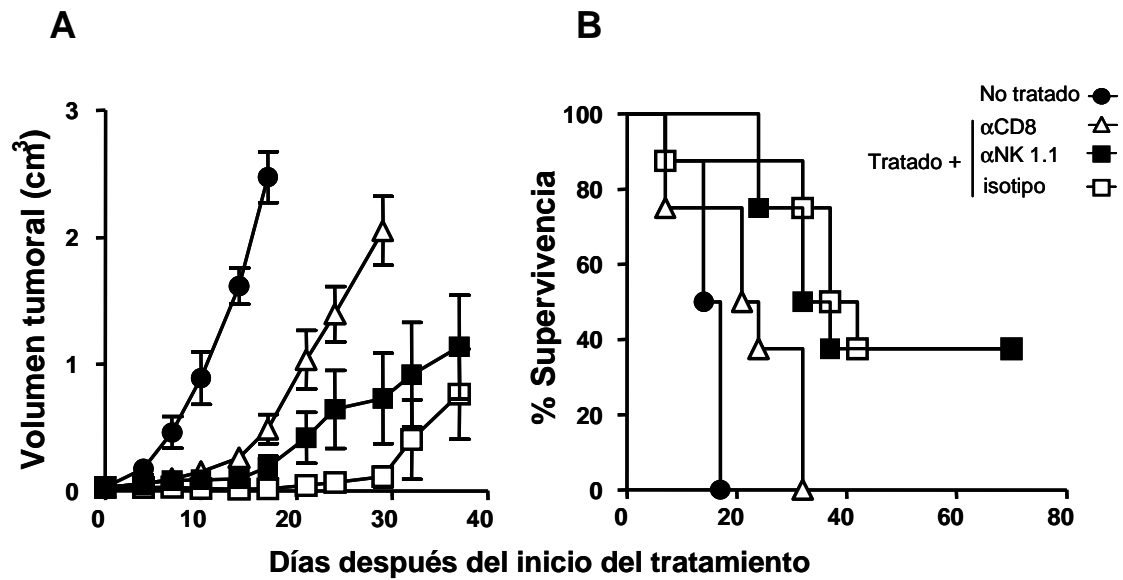


Figura R29. La respuesta CD8 inducida por EDA-OVA + MAC es la principal responsable del rechazo tumoral. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=8/grupo$). Previamente al comienzo del tratamiento se administró a los diferentes grupos de ratones anticuerpos ($200 \mu\text{g}/ratón$) anti-CD8, anti-NK 1.1 o isotipo control, para deplecionar CD8 o NK. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días con EDA-OVA + MAC. Se utilizó un grupo no tratado como control. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (A) y la supervivencia (B).

Para comprobar si el efecto antitumoral de las células NK podría ocurrir no sólo de manera directa sobre las células tumorales, sino también indirectamente colaborando en la activación de los LTc CD8, se realizó un experimento de vacunación en ratones deplecionados de células NK y se midió la respuesta de los LTc. Se observó una disminución del 15 – 20% en la respuesta CD8 cuando se inmunizaron ratones con EDA-OVA + MAC deplecionados de células NK ($p < 0,01$) (Figura R30), lo que demostró un efecto de las células NK sobre los LTc CD8.

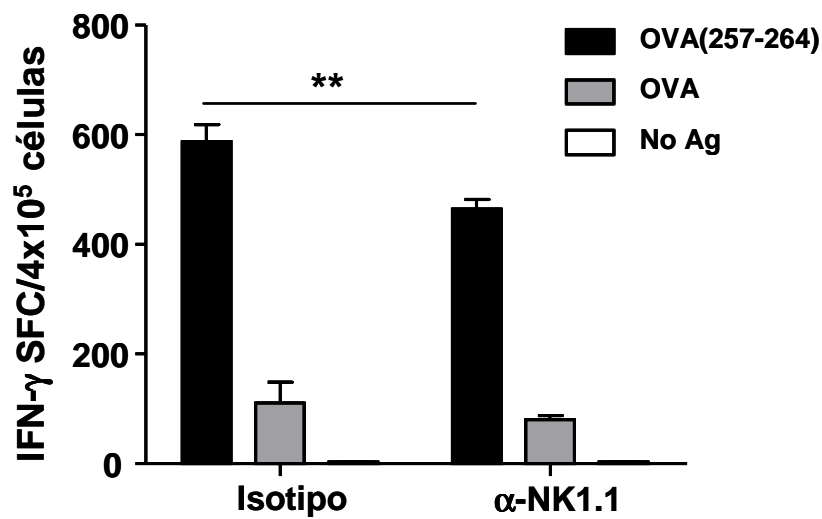


Figura R30. La inducción de respuestas CD8 tras la inmunización con EDA-OVA + MAC depende parcialmente de las células NK. Ratones C57BL/6 ($n= 3/grupo$) previamente tratados con anticuerpos anti-NK 1.1 para deplecionar NK o su isotipo como control, recibieron una única administración de EDA-OVA + MAC. Siete días después se sacrificaron los ratones para medir respuestas frente al péptido OVA(257-264) y la proteína OVA analizando la producción de IFN- γ mediante ELISPOT. **, $p < 0,01$.

Todos estos resultados indicaban que las células CD8 son la principal población efectora responsable de los rechazos tumorales.

1.4.3. Respuestas frente a otros antígenos del tumor

Para analizar el papel antitumoral de las células T específicas de otros antígenos del tumor no utilizados en la inmunización, 80 días tras la primera administración del tumor B16-OVA, a aquellos ratones que consiguieron rechazarlo, se les inyectó de nuevo células tumorales B16-OVA o B16-F10. Se observó que ninguno de los ratones curados con el tratamiento EDA-OVA + MAC desarrolló tumores cuando se volvían a inocular células B16-OVA, mientras que en los ratones control todos los tumores crecieron rápidamente. Sorprendentemente, cuando estos ratones curados se redesafiaron con células B16-F10, las cuáles no expresan OVA, un 80% de los ratones permanecieron libres de tumor (**Figura R31**).

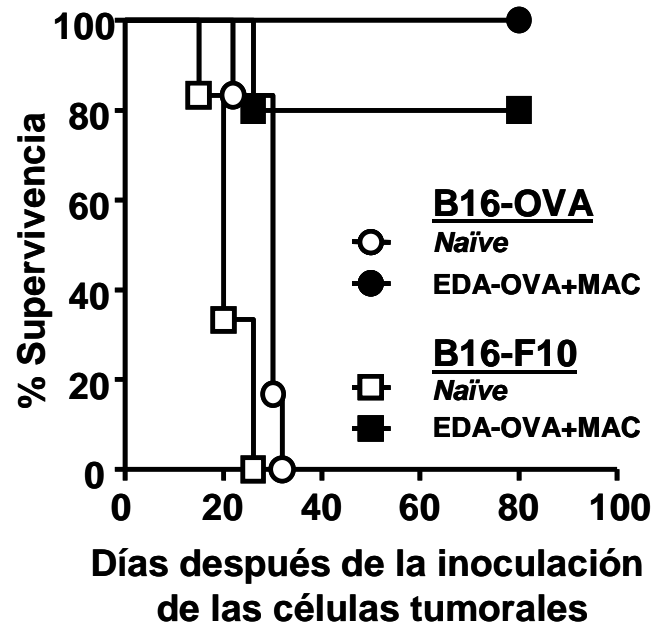


Figura R31. Protección frente al crecimiento de nuevos tumores en ratones que han rechazado tumores B16-OVA. Ratones C57BL/6 ($n= 5-6/grupo$) que 60 días antes habían rechazado tumores B16-OVA mediante el tratamiento con EDA-OVA + MAC, recibieron 10^5 células B16-OVA o B16-F10 *i.d.*. Paralelamente se inyectaron ratones *naïve* con ambas líneas tumorales que se emplearon como controles. Se midió la supervivencia durante un periodo de 80 días.

El estudio *in vitro* de las respuestas inducidas en ratones que habían rechazado los tumores mostró que no sólo eran capaces de reconocer OVA, sino también antígenos propios del melanoma como TRP2 (**Figura R32**), indicando que este tratamiento, además de inducir respuestas frente al antígeno administrado, también induce respuestas frente a otros antígenos expresados por las células tumorales.

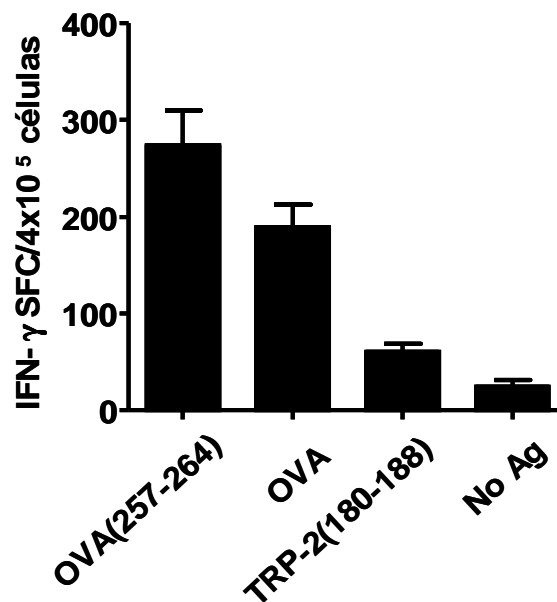


Figura R32. La administración de EDA-OVA + MAC induce LT frente a diferentes antígenos del tumor. Se midieron las células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT en los ratones de la **Figura R31** frente a OVA(257-264), TRP2(180-188) y la proteína OVA.

Además, en los experimentos mostrados en la **Figura R24** (tratamiento durante 10 días de ratones con tumor) también se analizó la inducción de respuesta frente al péptido TRP2(180-188). Se observó que diez días después del tratamiento de los tumores B16-OVA, se indujeron respuestas frente a dicho péptido en los grupos que recibieron EDA-OVA + MAC u OVA + MAC (**Figura R33**).

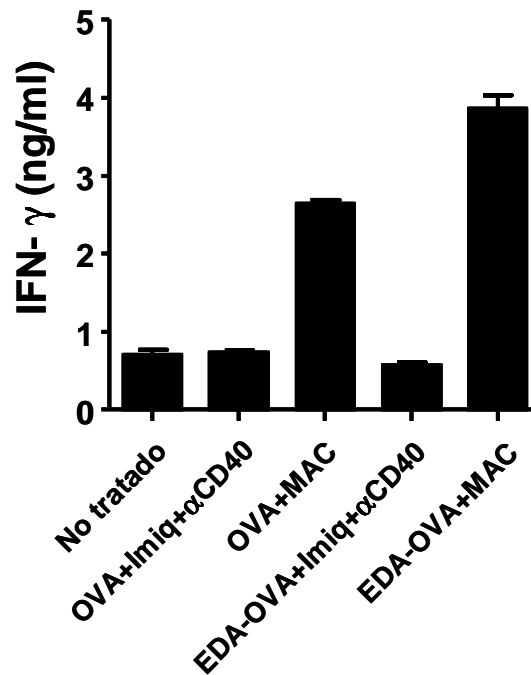


Figura R33. Los ratones tratados con OVA + MAC o EDA-OVA + MAC, inducen respuestas frente a TRP2(180-188). Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n= 5/grupo$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm los ratones fueron tratados durante un periodo de 10 días con las diferentes combinaciones de adyuvantes. Los esplenocitos de los ratones utilizados se estimularon con 10 μ g/ml del péptido TRP2(180-188) y a las 48 horas se recogieron sobrenadantes para medir los niveles de IFN- γ mediante ELISA.

1.5. Combinación de EDA-Ag + MAC en el tratamiento de otros tumores

El hallazgo de que la inmunización con EDA-OVA + MAC inducía respuestas frente a TRP2 y que estos animales estaban protegidos frente a tumores B16-F10, sugería que un nuevo tratamiento basado en la administración de MAC junto a EDA fusionado al antígeno TRP2 (EDA-TRP2) podría ser útil en el tratamiento de tumores B16-F10. Para ello se construyó la proteína EDA fusionada con el fragmento 59-257 de TRP2.

1.5.1. Actividad y eficacia antitumoral de la proteína EDA-TRP2

En primer lugar, antes de analizar el efecto de la proteína EDA-TRP2 en el tratamiento de tumores, se estudió su capacidad de activar la inmunidad innata y adaptativa.

La activación de la inmunidad innata se estudió midiendo la capacidad de esta proteína de inducir *in vitro* la producción de TNF- α tras su incubación con la línea de monocitos humana THP-1. Se encontró que EDA-TRP2, al contrario que la proteína previamente digerida con proteinasa K, era capaz de activar la producción de TNF- α (**Figura R34A**).

La activación de inmunidad adaptativa se estudió tras inmunizar ratones con EDA-TRP2 + MAC. Siete días después de la inmunización se detectó la producción específica de IFN- γ en ensayos de ELISPOT tras la estimulación con el DTc TRP2(180-188) (**Figura R34B**). De la misma manera, los esplenocitos reconocieron a la proteína EDA-TRP2 (**Figura R34C**), en comparación con los controles que contenían EDA o EDA-OVA.

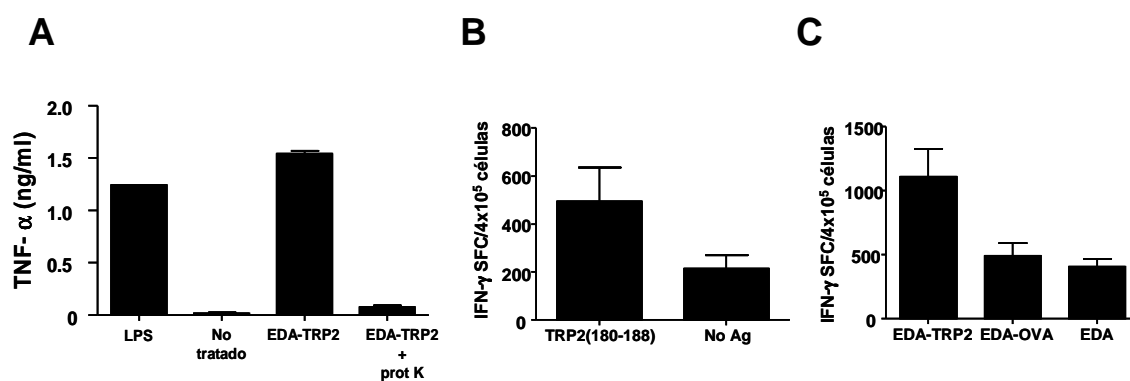


Figura R34. La proteína de fusión EDA-TRP2 activa la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Se incubaron 10^6 células THP-1 por pocillo con EDA-TRP2 ($1\mu\text{M}$), EDA-TRP2 previamente digerida con proteinasa K, LPS ($0,1\ \mu\text{g/ml}$) o se dejaron sin estimular en medio de cultivo. A las 15 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió el TNF- α mediante ELISA (**A**). Se inmunizaron ratones C57BL/6 ($n=3/\text{grupo}$) con EDA-TRP2 + MAC. Siete días después se sacrificaron los ratones para medir respuestas frente al péptido TRP2(180-188), (**B**) y la proteína EDA-TRP2 (**C**) mediante un ELISPOT que analizaba la producción de IFN- γ .

Tras los experimentos anteriores se estudió la eficacia de la combinación EDA-TRP2 + MAC en el tratamiento de tumores B16-F10. Los resultados mostraron una gran agresividad de estas células tumorales en comparación con los tumores B16-OVA, ya que los ratones sin tratar se sacrificaron todos el día 13. Aún así esta estrategia mostró una gran eficacia, ya que 40 días tras el inicio del tratamiento, todavía conseguían sobrevivir el 30% de los ratones (Figura R35).

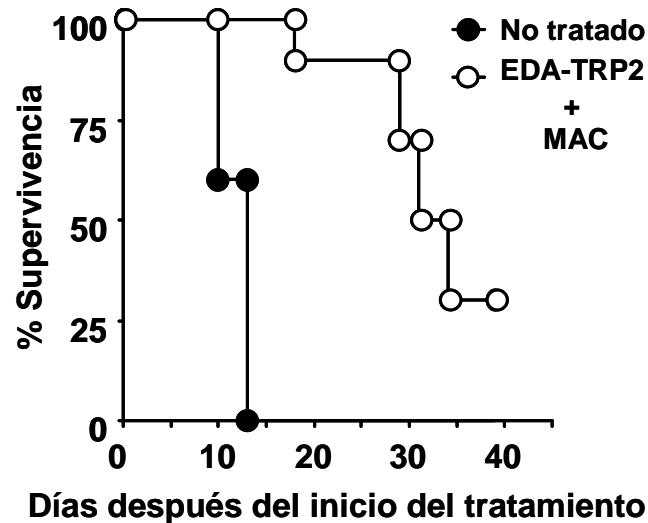


Figura R35. La inmunoterapia EDA-TRP2 + MAC tiene un potente efecto antitumoral en un modelo tumoral B16-F10. Se inocularon 10^5 células B16-F10 *i.d.* en ratones C57BL/6 ($n=10/grupo$). Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm un grupo de ratones fue tratado durante un periodo de 20 días con EDA-TRP2 + MAC. Un grupo no tratado se utilizó como control. Se midió la supervivencia.

2. POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA MEDIANTE EL BLOQUEO DE CITOQUINAS INMUNOSUPRESORAS

En diferentes estrategias de inmunoterapia se ha combinado la inmunoestimulación con la inhibición de citoquinas inmunosupresoras. Esto ha permitido por un lado estudiar la implicación que tienen estas citoquinas sobre la respuesta inmunitaria en diferentes modelos tumorales e infecciones crónicas, y por otro lado, ha sentado las bases de futuras estrategias de inmunoterapia combinada (Berzofsky *et al.* 2012). Como previamente ya habíamos caracterizado el efecto de las estrategias inmunoestimuladoras en el modelo tumoral B16-OVA, continuamos en este modelo el estudio de la relevancia del bloqueo de la inmunosupresión junto con la vacunación.

Nuestro laboratorio lleva años centrado en el desarrollo y aplicación de péptidos inhibidores de moléculas inmunosupresoras que pudieran aplicarse en la restauración y potenciación de la respuesta inmunitaria. En este sentido, trabajos pioneros con péptidos inhibidores de TGF- β (P144 y P17) e IL-10 (P9 y P13) (Ezquerro *et al.* 2003; Santiago *et al.* 2005; Dotor *et al.* 2007; Gil-Guerrero *et al.* 2008; Llopiz *et al.* 2009; Diaz-Valdes *et al.* 2011a; Diaz-Valdes *et al.* 2011b) han mostrado la utilidad de esta estrategia y sugieren que pueden ser aplicados en la vacunación y tratamiento de enfermedades virales y tumorales.

2.1. Efecto de la inhibición del TGF- β en la inmunoterapia

2.1.1. Producción de TGF- β en tumores B16-OVA

Antes de estudiar el efecto de la inhibición de TGF- β en la eficacia de la inmunoterapia, se analizó la expresión de TGF- β en tumores B16-OVA. Las células de un homogeneizado tumoral se analizaron para medir la expresión de TGF- β (**Figura R36A**). Alrededor del 80% las células tumorales mostraron la presencia de LAP (componente de un complejo inactivo del TGF- β), ligado a la membrana (**Figura R36B**). En los análisis de los TILs, las Treg (**Figura R36C**) mostraron también expresión de TGF- β en su membrana (**Figura R36D**). Estas

células CD4⁺ CD25⁺ también eran FoxP3⁺ (**Figura R36E**). Por tanto, TGF-β se expresaba en el microambiente tumoral de tumores B16-OVA en las células tumorales y en las células Treg.

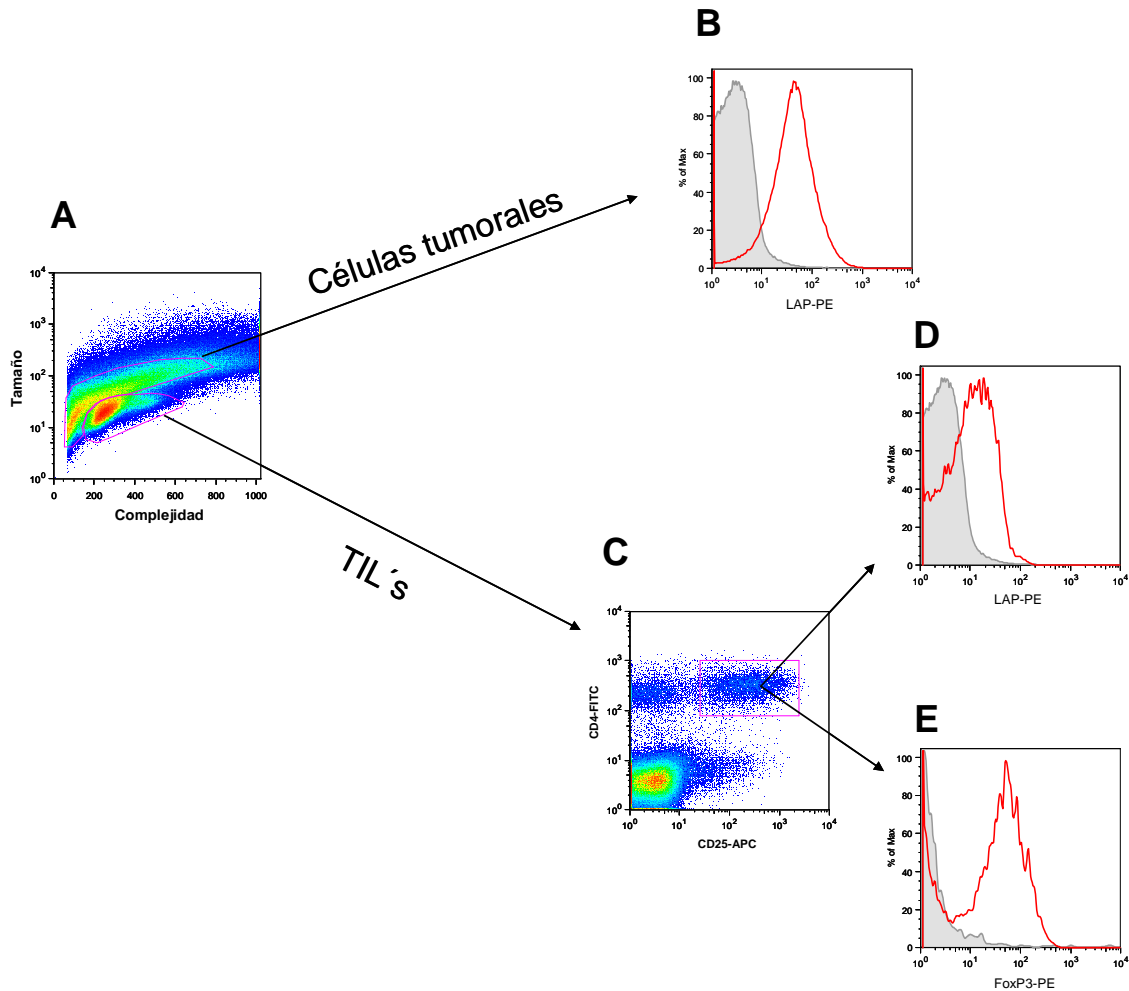


Figura R36. Expresión del TGF-β en un homogeneizado de tumores B16-OVA. Tumores B16-OVA (10 mm de diámetro) de ratones C57BL/6 se homogeneizaron y las células se analizaron por citometría de flujo. En el homogeneizado tumoral se seleccionaron las células tumorales y los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) (A). La expresión de TGF-β se analizó con anticuerpos anti-LAP en las células tumorales (B). Los linfocitos se marcaron con anticuerpos específicos anti-CD4, anti-CD25, anti-LAP y anti-FoxP3. En la población de linfocitos CD4⁺ CD25⁺ (C) se analizó la expresión de LAP (D) y FoxP3 (E).

2.1.2. Potenciación de la inmunoterapia

Una vez demostrada la expresión de TGF-β en tumores B16-OVA, se analizó el efecto de su inhibición analizando la respuesta inmunitaria antitumoral y el crecimiento de los tumores al combinarlo con una estrategia de inmunoterapia.

2.1.2.1. Inmunidad innata

Para analizar el efecto sobre la inmunidad innata, en ratones que tenían tumores de 5 mm, se estudió la actividad de las CD y de las células NK 48 horas después de la administración de los adyuvantes poly (I:C) y anti-CD40, con o sin el péptido inhibidor de TGF- β P144. La inhibición de TGF- β aumentó la expresión del marcador de maduración CD86 en la población CD11c⁺ (**Figura R37A**) y también indujo una mayor producción de IFN- γ por las células NK (**Figura R37B**), por encima de aquellos niveles inducidos tras la administración de los adyuvantes, mostrando que la inmunidad innata se beneficiaba del bloqueo del TGF- β en ratones con tumor B16-OVA.

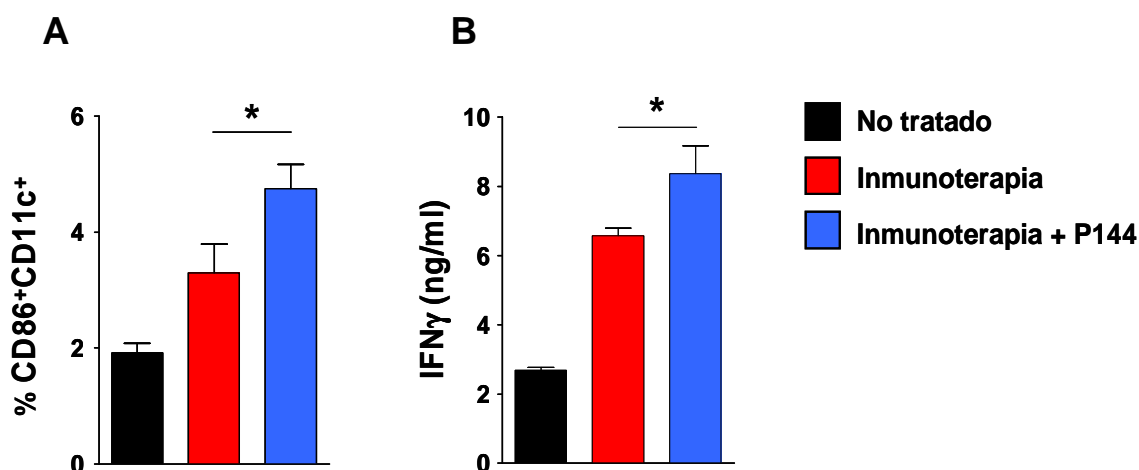


Figura R37. La inhibición del TGF- β mejora la respuesta innata en ratones con tumor. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado ($n=6$); 2) Inmunoterapia: Adyuvantes poly (I:C) + anti-CD40 ($n=8$); y 3) Inmunoterapia + P144 ($n=8$). Los adyuvantes se administraron el día 0 (*i.t.*) y el péptido P144 el día 0 y a las 24 horas (*i.p.*). A las 48 horas se analizaron los esplenocitos de los ratones para medir la activación de las CD, estudiando el porcentaje de CD86⁺ en la población CD11c⁺ (**A**), y la activación de las células NK mediante ELISA de IFN- γ de los sobrenadantes de esplenocitos estimulados 48 horas con la línea celular YAC-I (**B**). *, $p < 0,05$.

2.1.2.2. Inmunidad adaptativa

Para analizar el efecto de la inhibición de TGF- β sobre la respuesta adaptativa, se inmunizó a ratones con tumor con OVA + poly (I:C) + anti-CD40, se repitió la administración de adyuvantes los días 2 y 4 y se trataron

diariamente durante una semana con P144. Se observó que la respuesta adaptativa se potenciaba con el bloqueo de TGF- β , ya que los esplenocitos de estos ratones inducían niveles superiores de IFN- γ frente al péptido OVA(257-264) ($p < 0,05$) con respecto a los esplenocitos de ratones que sólo recibieron inmunoterapia (**Figura R38**).

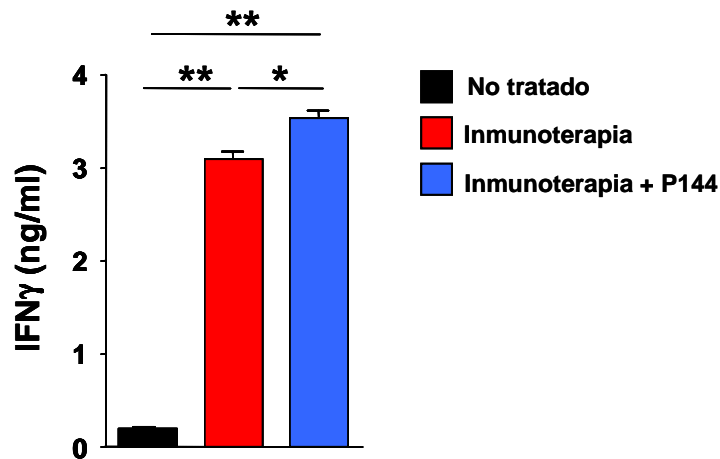


Figura R38. La inhibición del TGF- β mejora la inmunidad adaptativa en ratones con tumor. Se inocularon 10^5 células B16-OVA (*i.d.*) en ratones C57BL/6 ($n = 6-8$ ratones/grupo). Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5 mm se trataron los ratones con Inmunoterapia (OVA (día 0), tres dosis de adyuvantes (poly (I:C) + anti-CD40 (días 0, 2 y 4)) todos por vía *i.t.*, y el péptido P144 *i.p.* cada día. El día siete se sacrificaron los ratones para medir la respuesta adaptativa frente el péptido OVA(257-264). A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes donde se midieron los niveles de IFN- γ mediante un ELISA. Como grupo control se utilizó un grupo con tumor no tratado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

2.1.3. Respuesta antitumoral

Los datos *ex vivo* observados indicaron que la inhibición de TGF- β en los ratones con tumores B16-OVA potenciaban la inmunidad innata y adaptativa inducida por la inmunoterapia. Por otro lado también se reflejaron *in vivo*, puesto que tras siete días de tratamiento, en los ratones que recibieron P144 se detectaron mayores niveles de IFN- γ en el homogeneizado tumoral (**Figura R39A**), lo que a su vez se tradujo en un mayor efecto antitumoral con respecto al grupo tratado sólo con inmunoterapia ($p < 0,05$) (**Figura R39B**).

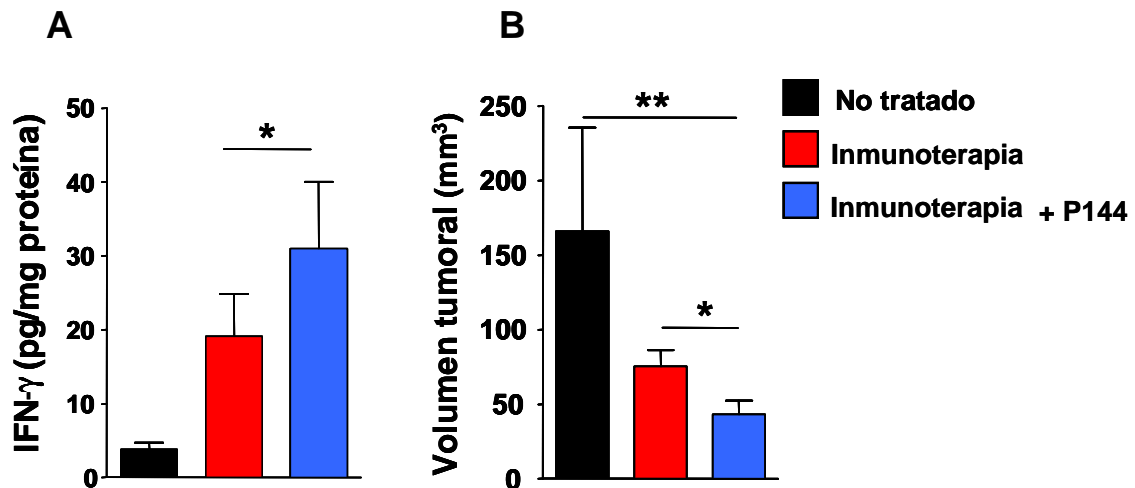


Figura R39. El bloqueo del TGF- β en la inmunoterapia presenta mejores efectos antitumorales. En los ratones utilizados en la **Figura R38**, se extrajeron los tumores y se homogeneizaron para obtener el extracto y medir los niveles de proteína de IFN- γ (A). Previamente se midió el volumen tumoral (B). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

TGF- β es responsable de la producción de otras citoquinas inmunosupresoras, como IL-10 (Diaz-Valdes *et al.* 2011a). Por ello, también se midieron los niveles de esta citoquina en los tumores de los ratones de los experimentos anteriores. De acuerdo a los resultados anteriores, los ratones tratados con inmunoterapia y P144 presentaron niveles inferiores de IL-10 que el resto de los grupos ($p < 0,01$) (**Figura R40**).

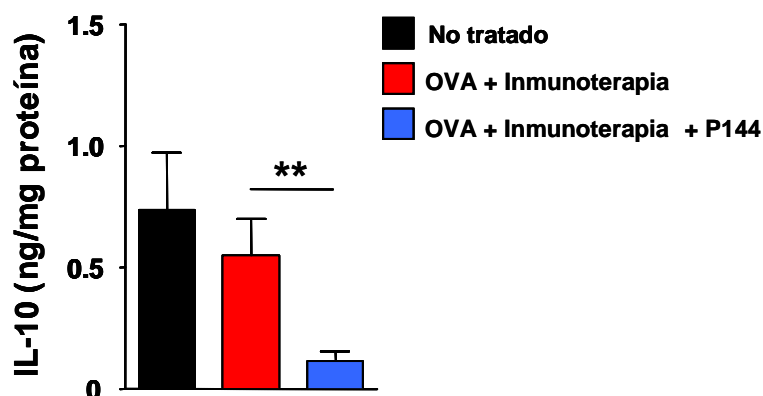


Figura R40. El efecto antitumoral de la inhibición del TGF- β está asociado con bajos niveles de IL-10 intratumoral. En los ratones de la **Figura R38** se extrajeron los tumores y se homogeneizaron para obtener el extracto y medir los niveles de proteína de IL-10. **, $p < 0,01$.

Puesto que estudios previos realizados en nuestro laboratorio en el modelo tumoral EG7-OVA habían demostrado que la inhibición conjunta de TGF- β con los péptidos inhibidores P144 y P17 en combinación con poly (I:C) + anti-CD40 aumentaban el rechazo tumoral de un 15% a un 50% (Llopiz *et al.* 2009), estudiamos el efecto de la inhibición de TGF- β con estos péptidos en el tratamiento de tumores B16-OVA, combinándolos con el adyuvante Imiquimod.

Para ello, cuando el tumor alcanzó unos 5 mm de diámetro, se administró cada cuatro días el adyuvante Imiquimod y cada 48 horas los péptidos inhibidores del TGF- β , P17 y P144, durante 20 días. Como se observa en la **Figura R41** el bloqueo de TGF- β durante el período de tratamiento potenció el efecto del adyuvante Imiquimod, induciendo un retraso significativo en el crecimiento tumoral ($p < 0,05$). Sin embargo, una vez finalizó el tratamiento, todos los tumores crecieron y ningún ratón consiguió finalmente rechazar el tumor (datos no mostrados).

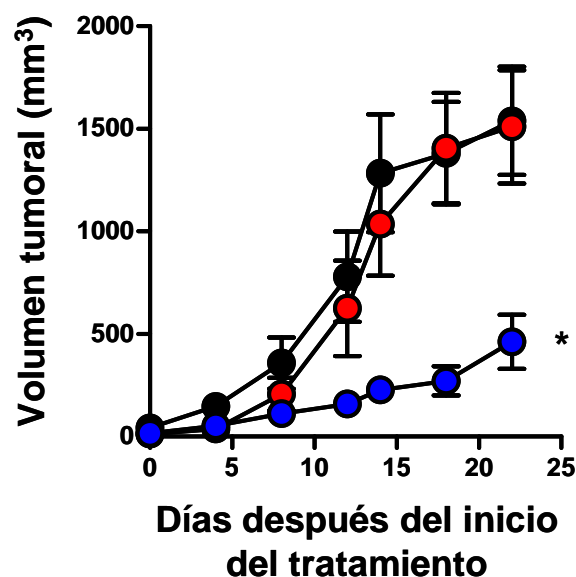


Figura R41. La inhibición de TGF- β potencia el efecto antitumoral del tratamiento con Imiquimod. Se inocularon 10^5 células B16-OVA (*i.d.*) en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado \bullet ($n= 6$); 2) Inmunoterapia (Imiquimod) \bullet ($n= 6$); 3) Inmunoterapia + P144 & P17 \bullet ($n= 6$). Los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días. *, $p < 0,05$ IT + P144 & P17 vs Resto de grupos.

2.2. Efecto de la inhibición de IL-10 en la inmunoterapia

Una vez demostrada la relevancia de la inhibición de TGF- β en las estrategias de inmunoterapia antitumoral, y conociendo el efecto sobre otra citoquina inmunosupresora (IL-10) (**Figura R40**), nos planteamos estudiar el efecto de la inhibición de IL-10 sobre la potenciación de las terapias antitumorales. En la bibliografía está descrito el importante papel inmunosupresor que ejerce IL-10 en el modelo de melanoma B16-OVA. Por un lado IL-10 actúa como factor de crecimiento autocrino, promoviendo la proliferación de las células tumorales, y por otro, como inmunosupresor de la respuesta inmunitaria frente al tumor (Seo *et al.* 2001; Garcia-Hernandez *et al.* 2002).

Además, la inhibición de IL-10 puede favorecer la inducción de respuestas Th1, dependiendo del tipo de plataforma de vacunación que se emplee (Darrah *et al.* 2010). Con este propósito, se ensayaron diferentes protocolos de inmunización, donde se utilizaron distintos tipos de adyuvantes (ligandos de TLR) junto con el antígeno OVA, con o sin el bloqueo de IL-10 (mediante la administración de anticuerpos anti-IL-10R). Una semana después se analizaron las respuestas CD8 frente al péptido OVA(257-264), para verificar de este modo el efecto de la inhibición de esta citoquina. Los resultados mostraron que las inmunizaciones con los adyuvantes Imiquimod (**Figura R42A**) o CpG (**Figura R42B**), se beneficiaban de la inhibición de IL-10. En el caso de EDA (**Figura R42C**), también se detectó un aumento de la respuesta tras el bloqueo de IL-10, pero la magnitud de las respuestas fue mucho menor. Finalmente, en el caso de poly (I:C) (**Figura R42D**) no se apreciaron diferencias.

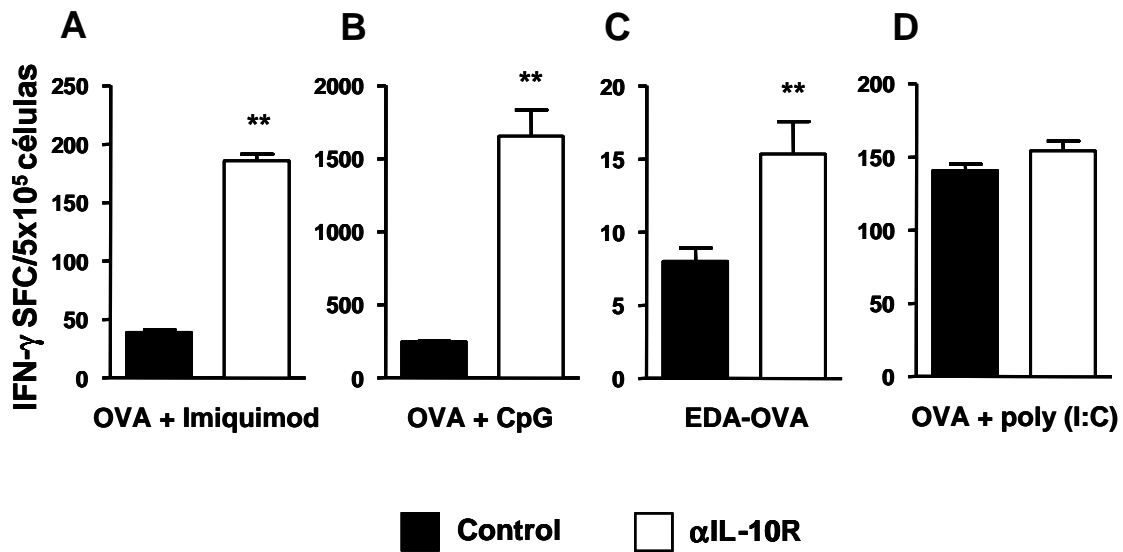


Figura R42. El bloqueo de la IL-10 potencia la respuesta CD8 en los protocolos de vacunación con determinados adyuvantes. Se inmunizaron ratones C57BL/6 ($n= 3$ ratones/grupo) con OVA (500 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (s.c.)) junto con las diferentes combinaciones de adyuvantes. El día de la inmunización también se administró el anticuerpo anti-IL10R (500 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (i.p.)). Una semana después se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con el péptido OVA(257-264). La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT. **, $p < 0,01$.

2.2.1. Efecto de los péptidos inhibidores de IL-10: P9 y P13

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron la eficacia de los péptidos inhibidores de IL-10 (P9 y P13), donde además de tener efectos *in vitro*, potenciaban las propiedades inmunoestimuladoras de las CD, aumentando las respuestas de LT en un protocolo de vacunación basado en la administración de CD tratadas *ex vivo* con estos péptidos (Diaz-Valdes *et al.* 2011b). Por ello, se planteó el estudio de su eficacia inhibidora en un modelo de vacunación basado en la administración de combinaciones de antígeno y adyuvantes, que no requiriera la preparación de CD, y donde por tanto habría que administrar los péptidos *in vivo*.

Antes de analizar el efecto *in vivo* de los péptidos en un modelo de inmunoterapia donde fuera relevante la inhibición de IL-10 (como es el caso de los tumores), se estudió su efecto inmunopotenciador sobre la vacunación, en ausencia de otras fuentes de IL-10 diferentes a las inducidas por la propia vacunación. Para ello se inmunizaron ratones *naïve* con OVA + CpG y durante

una semana se administraron diariamente los péptidos. El día 7 se midieron las respuestas frente al péptido OVA(257-264), donde no se encontró ningún efecto beneficioso derivado de la administración de los péptidos P9 o P13 (**Figura R43A**). Puesto que la vida media de los péptidos en ensayos *in vivo* es muy corta, decidimos aumentar su biodisponibilidad administrándolos 2 veces al día, lo que podría mejorar así su actividad en el bloqueo de IL-10. En esta ocasión, se observó que tanto P9 ($p < 0,01$) como P13 ($p < 0,05$) mejoraron las respuestas frente al antígeno OVA(257-264) (**Figura R43B**).

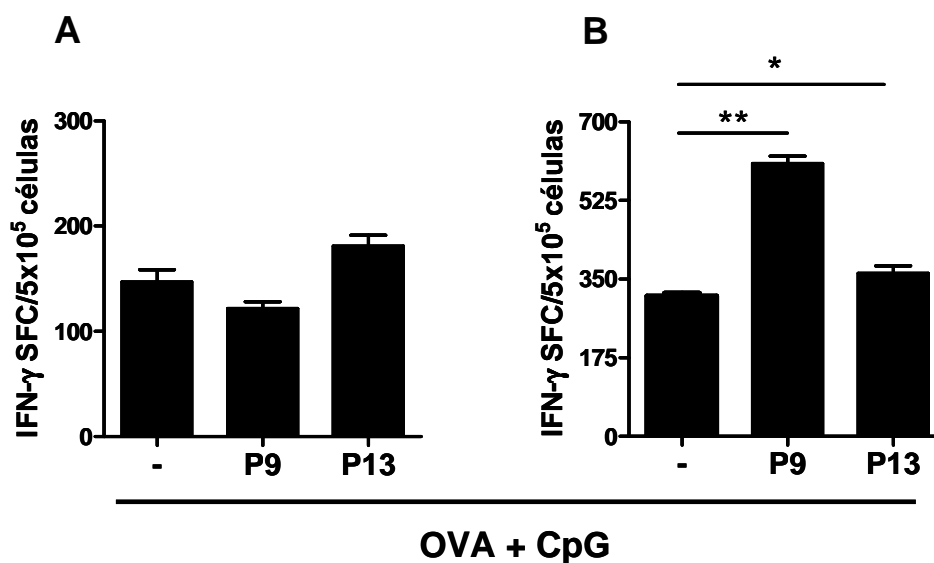


Figura R43. La administración dos veces al día de los inhibidores P9 y P13 potencia la respuesta inducida por la vacunación con OVA + CpG. Se inmunizaron ratones C57BL/6 ($n= 3$ ratones/grupo) con OVA + CpG por vía s.c.. Algunos grupos recibieron también los péptidos P9 o P13 (*i.p.*) una (**A**) o dos (**B**) veces cada 24 horas durante una semana. El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con el péptido OVA(257-264). La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Estos resultados indicaron que los péptidos, aún teniendo buenos resultados *in vitro* y *ex vivo*, tenían un efecto *in vivo* limitado, presumiblemente debido a su corta vida media. Aún así, se decidió utilizar P9 (que mostró tener mejores efectos que P13) en combinación con protocolos de inmunoterapia en ratones con tumores B16-OVA. La inmunoterapia consistió en la administración del antígeno OVA junto con el adyuvante Imiquimod, modelo en el que previamente habíamos demostrado que la inhibición de IL-10 potenciaba la

respuesta, (**Figura R42A**). Así, se administró OVA el primer día de tratamiento, el adyuvante Imiquimod los tres primeros días de cada semana y P9 todos los días, tanto por vía *i.t.* como *i.p.*.

Los resultados tras 20 días de tratamiento indicaron que tanto la inmunoterapia (OVA + Imiquimod), como P9, administrados de forma independiente, retrasaron el crecimiento tumoral aproximadamente 5 - 6 días ($p < 0,05$) con respecto al grupo no tratado, sin llegar a rechazar ningún tumor. Sin embargo, el tratamiento combinado de inmunoterapia + P9 no sólo retrasó aún más el crecimiento tumoral ($p < 0,05$, *IT + P9* vs. *IT* o *P9*; $p < 0,01$, *IT + P9* vs. *NT*) (**Figura R44A**), lo que prolongaba la supervivencia, sino que también fue capaz de rechazar el tumor en un 15% de los animales tratados (**Figura R44B**).

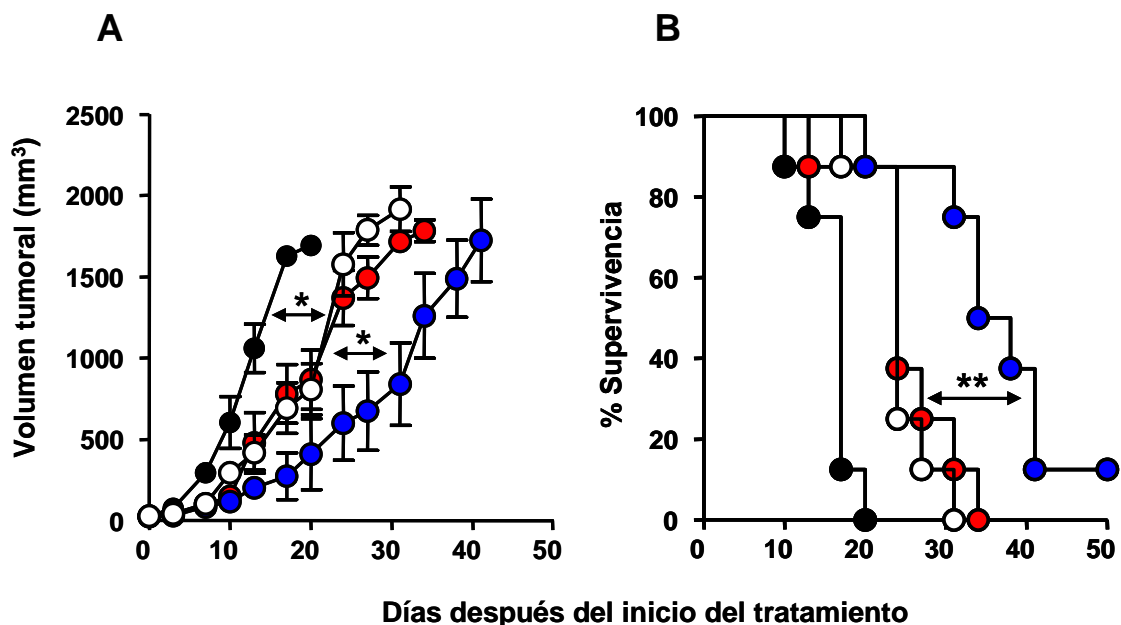


Figura R44. Efecto del péptido inhibidor de IL-10 P9 en la eficacia de la inmunoterapia con el adyuvante Imiquimod. Se inocularon 10^5 células B16-OVA (*i.d.*) en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado ● ($n=8$); 2) P9 ○ ($n=8$); 3) Inmunoterapia (OVA+Imiq) ● ($n=8$); 4) Inmunoterapia + P9 ● ($n=8$). En el tratamiento de inmunoterapia, OVA ($500 \mu\text{g}/\text{ratón}$ (*i.t.*)) se administró el primer día y el adyuvante Imiquimod los tres primeros días de cada semana. P9 se administró todos los días ($100 \mu\text{g}/\text{ratón}$ (*i.t.* e *i.p.*)). Los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (**A**) y la supervivencia (**B**). *, $p < 0,05$, *IT + P9* vs. *IT* o *P9*; **, $p < 0,01$, *IT + P9* vs. Resto de grupos.

Una vez analizado el efecto antitumoral, se estudió la respuesta inmunitaria en ratones tratados durante dos semanas de manera similar, mediante el análisis de las células de los nódulos drenantes del tumor. En cuanto a la inmunidad innata, existía una tendencia a potenciar la maduración de las CD en el grupo con el tratamiento combinado con respecto al grupo tratado sólo con inmunoterapia (**Figura R45A**), así como en la activación de las células NK, (**Figura R45B**). Estas diferencias alcanzaron valores estadísticamente significativos al analizar el IFN- γ producido por las células NK (**Figura R45C**). En el caso de la respuesta adaptativa, tanto la respuesta frente al péptido OVA(257-264) (**Figura R45D**) como frente a las células B16-OVA (**Figura R45E**), fue superior en el grupo tratado con la terapia combinada que en el grupo tratado sólo con inmunoterapia ($p < 0,05$). Curiosamente, la administración sólo de P9, que tenía un ligero efecto antitumoral, no mostró ninguna diferencia al analizar estos parámetros.

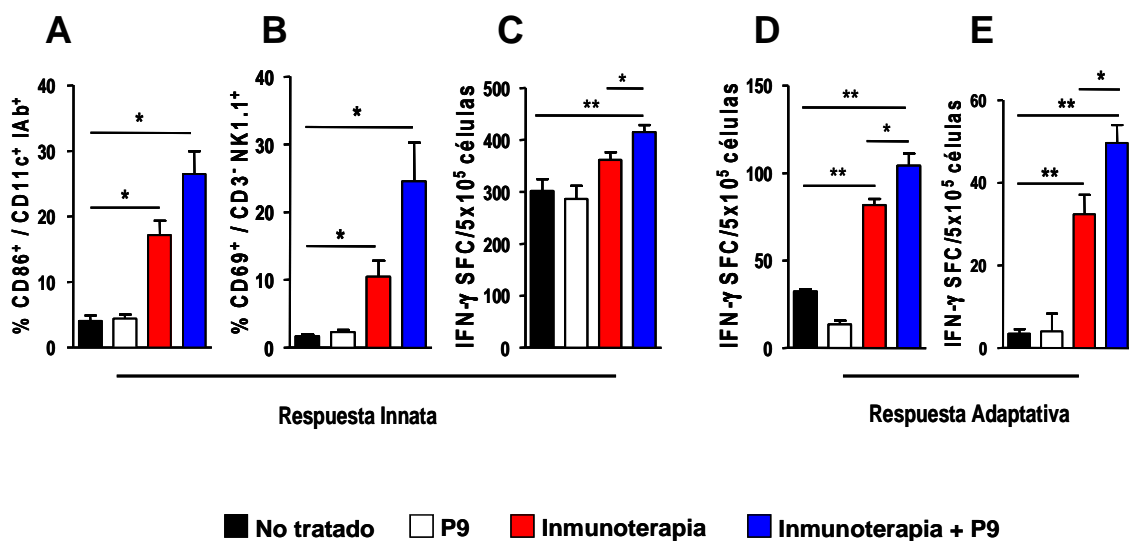


Figura R45. El péptido inhibidor de IL-10 P9 aumenta la respuesta inmunitaria inducida por la inmunoterapia en ratones con tumores B16-OVA. Ratones con tumor ($n= 4/grupo$) se trataron durante 2 semanas. Se distribuyeron los siguientes grupos: No tratado; P9; Inmunoterapia (OVA+Imiq); Inmunoterapia + P9. En el tratamiento de inmunoterapia, OVA (500 μ g/ratón (*i.t.*)) se administró el primer día y el adyuvante Imiquimod los tres primeros días de cada semana. P9 se administró todos los días (100 μ g/ratón (*i.t. e i.p.*)). A los 14 días, se sacrificaron los ratones para medir respuestas en los nódulos drenantes del tumor mediante ensayos de citometría (A y B) y ELISPOT (C, D y E). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

2.2.2. Potenciación de la inmunoterapia con el anticuerpo anti-receptor de IL-10

El tratamiento de tumores y las respuestas inducidas al bloquear IL-10 con P9 eran resultados prometedores. Sin embargo, la actividad limitada de P9 en experimentos *in vivo* nos hizo plantearnos cuál sería el potencial efecto antitumoral de bloquear la IL-10 en condiciones similares a las observadas en experimentos de vacunación como los mostrados en la **Figura R42**. De este modo, el tratamiento diario con P9 se sustituyó por administraciones semanales de un anticuerpo bloqueante del receptor de IL-10 (α IL-10R), manteniendo la misma inmunoterapia basada en la administración de OVA e Imiquimod.

En primer lugar se analizó los niveles de IL-10 sérica en ratones con tumor sometidos a los diferentes tratamientos. Los resultados mostraron que no sólo los ratones con tumor expresaron IL-10, sino que la propia inmunoterapia, OVA + Imiquimod, también aumentó los niveles de IL-10. Estos niveles se redujeron cuando se administró anti-IL10R tanto a ratones tratados como sin tratar (**Figura R46**).

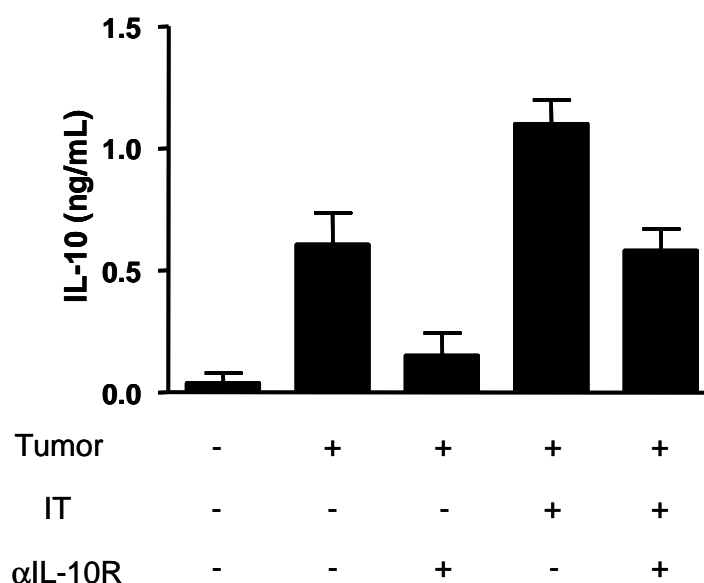


Figura R46. El anticuerpo anti-IL-10R disminuye los niveles de IL-10 sérica inducidos por el tumor y la inmunoterapia. Ratones con tumores de un diámetro de 10 mm ($n=3/grupo$), se trataron durante 1 semana con inmunoterapia (IT) (OVA (500 μ g/ratón, día 0 (*i.t.*)) + Imiquimod (días 0,1 y 2) + Ac. Isotipo (como control) o anti-IL10R (500 μ g/ratón, día 0 (*i.p.*)), o ratones sin IT con Ac. Isotipo o anti-IL10R. A los siete días se midió en el suero los niveles de IL-10 mediante un ELISA.

2.2.2.1. Efecto sobre la vacunación en ratones *naïve*

Antes de probar el efecto en el tratamiento antitumoral del bloqueo de IL10 con el anticuerpo anti-IL-10R combinado con la inmunoterapia (OVA + Imiquimod), se estudió su efecto sobre la respuesta inmunitaria en ratones sin tumor. Estos experimentos fueron similares a los presentados en la **Figura R42A**, difiriendo sólo en la administración de Imiquimod durante tres días en lugar de uno. Los resultados confirmaron el aumento de respuestas con la inmunoterapia cuando se combina con el anticuerpo anti-IL10R, obteniéndose diferencias significativas tanto en las respuestas CD8, analizadas frente al péptido OVA(257-264), como CD4, frente a la proteína OVA (**Figura R47**).

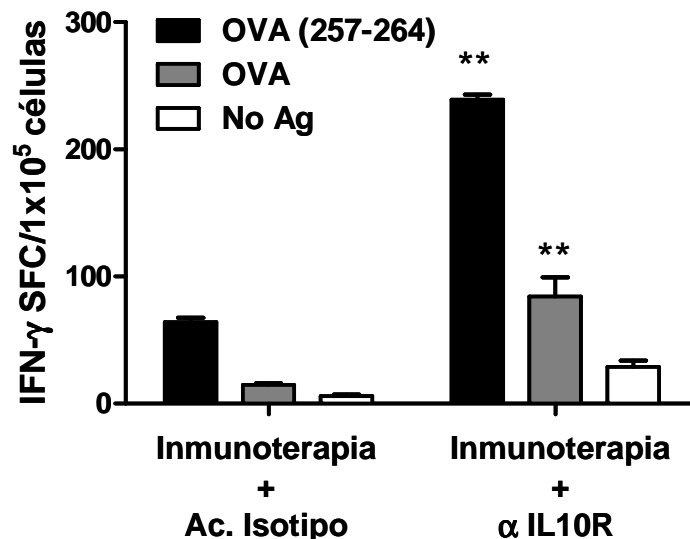


Figura R47. El bloqueo con el anticuerpo anti-IL10R potencia la respuesta de la inmunoterapia OVA + Imiquimod. Se inmunizaron ratones *naïve* C57BL/6 ($n=4$ /grupo) con la inmunoterapia OVA (500 μ g/ratón, día 0 (s.c.)) + Imiquimod (días 0,1 y 2) + Ac. Isotipo o anti-IL10R (500 μ g/ratón, día 0 (i.p.)). El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con antígenos de OVA. La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT. **, $p < 0.01$ IT + α IL10R vs IT + Ac. Isotipo.

La inhibición de IL-10 también potenció la actividad de las células NK, induciendo un número mayor de células NK productoras de IFN- γ ($p < 0,05$) (**Figura R48A**). Con respecto a otros parámetros de respuesta CD8, se

observó una tendencia a aumentar el porcentaje de células específicas de OVA(257-264), medidas utilizando tetrámeros OVA(257-264)/K^b (**Figura R48B**), la capacidad lítica mediante la expresión de CD107 en células productoras de IFN- γ (**Figura R48C**) y la producción de triples citoquinas simultáneamente (**Figura R48D**).

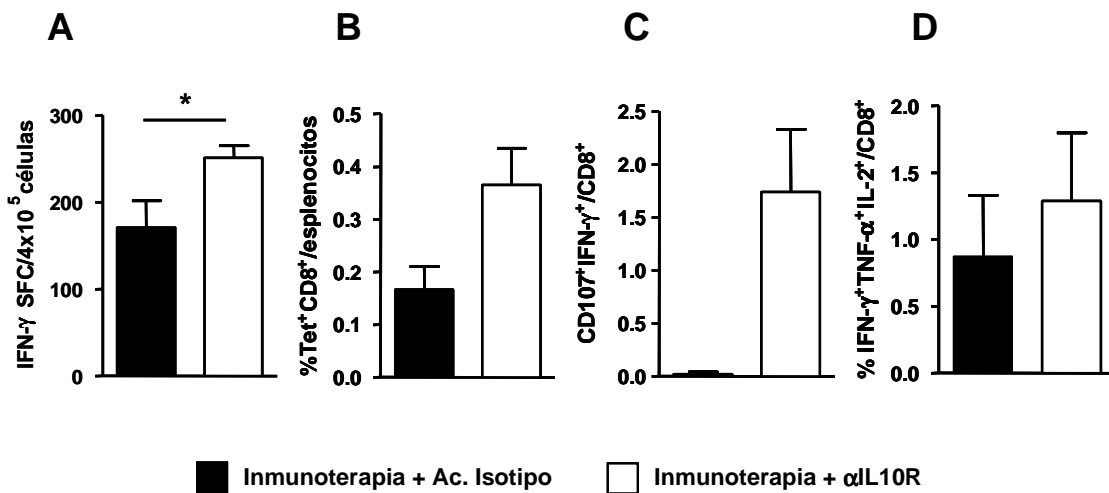


Figura R48. La combinación de inmunoterapia y anti-IL10R potencia tanto la respuesta efectora innata como adaptativa. Utilizando los mismos ratones que los mostrados en la **Figura R47** se analizaron las células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT estimulando a los esplenocitos con la línea celular NK-sensible YAC-I (**A**). También se analizó por citometría de flujo la frecuencia de LT CD8 específicos de OVA(257-264) utilizando tetrámeros OVA(257-264)/K^b (**B**), así como su capacidad de expresar CD107/IFN- γ (**C**) o IFN- γ , TNF- α e IL-2 simultáneamente (**D**). *, $p < 0,05$.

Por otro lado, también analizamos si el bloqueo de IL-10 no sólo estaba implicado en la fase de activación de los linfocitos T, sino también en la fase efectora. Para ello, una semana después de inmunizar ratones con OVA + Imiquimod, se trató a los animales con bloqueantes de IL-10 (P9 o anti-IL-10R) dos horas antes de recibir la transferencia de esplenocitos pulsados con OVA(257-264). Los resultados mostraron que ni el bloqueo con P9 ni con anti-IL-10R mejoraron la lisis de los esplenocitos pulsados con el antígeno, lo que indicaba que IL-10 estaba principalmente implicada en la fase de inducción. (**Figura R49**).

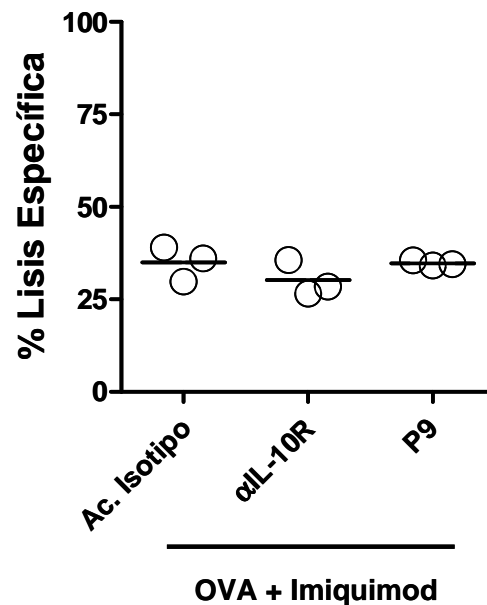


Figura R49. El bloqueo de la IL-10 no está implicado directamente en la fase efectora. Se inmunizaron ratones *naïve* C57BL/6 ($n= 3/grupo$) con la inmunoterapia OVA (100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (s.c.)) + Imiquimod. El séptimo día, dos horas antes de la transferencia de los esplenocitos pulsados con el péptido OVA(257-264), se les administró P9 (200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), anticuerpos anti-IL10R (250 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) o el Ac. Isotipo como control (250 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), todos por vía *i.p.* Un día después se sacrificaron los ratones para medir la actividad citotóxica frente a OVA(257-264) mediante un ensayo de lisis *in vivo*.

2.2.2.2. Efecto en el tratamiento de tumores

Una vez demostrado que el bloqueo de IL-10 era relevante en la plataforma de vacunación OVA + Imiquimod, y que el bloqueo con el anticuerpo parecía ser más eficaz que utilizando el péptido, estudiamos sus efectos antitumorales. Puesto que, como ya se ha descrito en apartados anteriores, el bloqueo de TGF- β también tenía efecto antitumoral, se utilizaron anticuerpos para bloquear ambas citoquinas inmunosupresoras. Los resultados mostraron que la inmunoterapia inducía un ligero retraso en el crecimiento de los tumores con respecto a los ratones no tratados, aunque ninguno de los ratones consiguió rechazar los tumores. Sin embargo, la combinación de la inmunoterapia con anti-IL-10R indujo un retraso significativo en el crecimiento tumoral con respecto a los grupos anteriores ($p < 0,05$) (**Figura R49A**) y

asociado a un 30% del rechazo de los tumores (**Figura R49B**). Por otro lado, se mostró que el bloqueo de TGF- β no era tan relevante como el de IL-10, donde el retraso no fue tan pronunciado y se rechazaron un 20% de los tumores. Finalmente, la combinación de inmunoterapia y el bloqueo de TGF- β e IL-10 pareció tener un efecto aditivo, rechazando el 50% de los tumores.

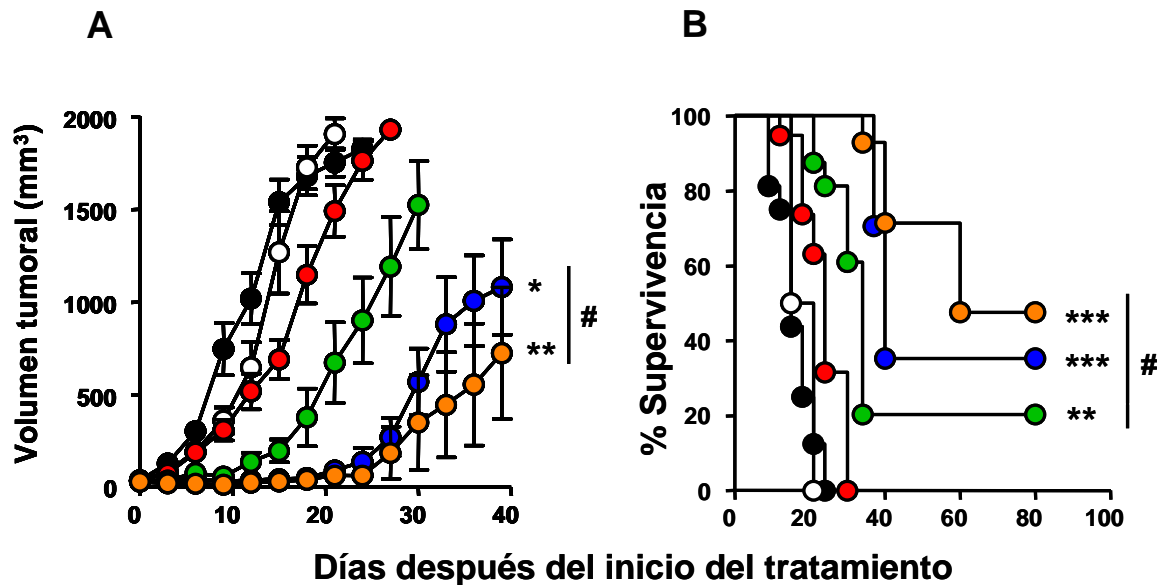


Figura R49. El bloqueo de IL-10 y TGF- β combinado con inmunoterapia tiene un potente efecto antitumoral. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado (●) ($n=16$); 2) anti-IL-10R (○) ($n=8$); 3) Inmunoterapia (OVA+Imiq) + Ac.Isotipo (●) ($n=16$); 4) Inmunoterapia + anti-IL-10R (●) ($n=16$); 5) Inmunoterapia + anti-TGF- β (●) ($n=8$); 6) Inmunoterapia + anti-IL-10R + anti-TGF- β (●) ($n=8$). La inmunoterapia consistió en la administración de OVA (500 μ g/ratón día 0 (*i.t.*)) + Imiquimod (días 0,1 y 2 de cada semana). Los anticuerpos Isotipo y anti-IL10R se administraron los días 0 y 7 (500 μ g/ratón *i.p.*) y anti-TGF- β los días 0, 4, 8 y 12 (200 μ g/ratón *i.p.*). Los ratones fueron tratados durante un período de 20 días. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (**A**) y la supervivencia (**B**). (# *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ Inmunoterapia + Ac. Isotipo vs Inmunoterapia + α IL-10R, Inmunoterapia + α TGF- β e Inmunoterapia + α IL-10R + α TGF- β).

2.2.2.3. Efecto sobre la respuesta inmunitaria inducida en ratones con tumor

La respuesta inmunitaria inducida por la combinación de inmunoterapia + anti-IL-10R se analizó en ratones con tumores tratados durante una semana. En los esplenocitos, se observó una mayor producción de IFN- γ en las células

NK ($p < 0,05$) (**Figura R50A**), CD8 ($p < 0,01$) (**Figura R50B**), CD4 ($p < 0,01$) (**Figura R50C**) y frente a las propias células tumorales B16-OVA ($p < 0,01$) (**Figura R50D**), cuando se realizaba el bloqueo de la IL-10 junto con la administración de inmunoterapia.

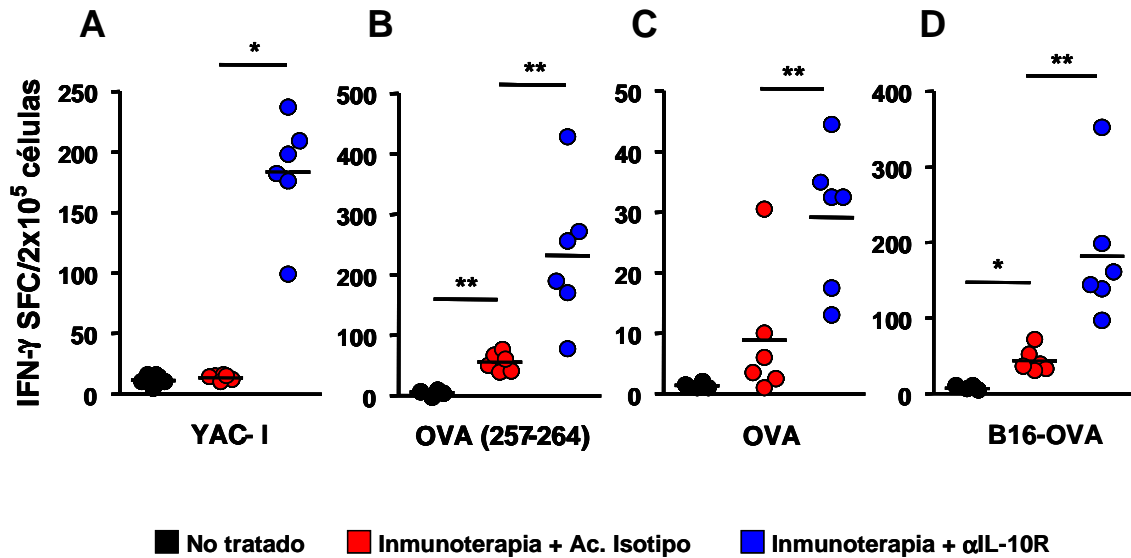


Figura R50. El bloqueo de IL-10 potencia la respuesta inmunitaria inducida por la inmunoterapia en ratones con tumor. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 8 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado ($n= 4$); 2) Inmunoterapia (OVA + Imiq) + Ac. Isotipo ($n= 6$); 3) Inmunoterapia + α IL-10R ($n= 6$). La inmunoterapia consistió en la administración de OVA (500 μ g/ratón, día 0 (*i.t.*)) + Imiquimod (días 0,1 y 2) + Ac. Isotipo o α IL10R (500 μ g/ratón, día 0 (*i.p.*)). Como grupo control se utilizó un grupo no tratado. El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con células YAC-I (**A**), el péptido OVA(257-264) (**B**), la proteína OVA (**C**) y las células tumorales B16-OVA (**D**). La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

También se analizó la respuesta en los nódulos linfáticos de drenaje del tumor. Confirmamos el aumento de la actividad efectora inducido por el bloqueo de IL-10, tanto al estudiar las células NK (**Figura R51A**) como el número de LT CD8 productores de dos (IFN- γ y TNF- α) (**Figura R51B**) o tres citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2) (**Figuras R51C**). Por otro lado, se analizó el efecto sobre poblaciones inmunosupresoras. En este caso, el bloqueo de IL-10 aumentó también el número de células reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (**Figura R51D**), y células mieloides supresoras monocíticas (**Figura R51E**) y granulocíticas (**Figura R51F**).

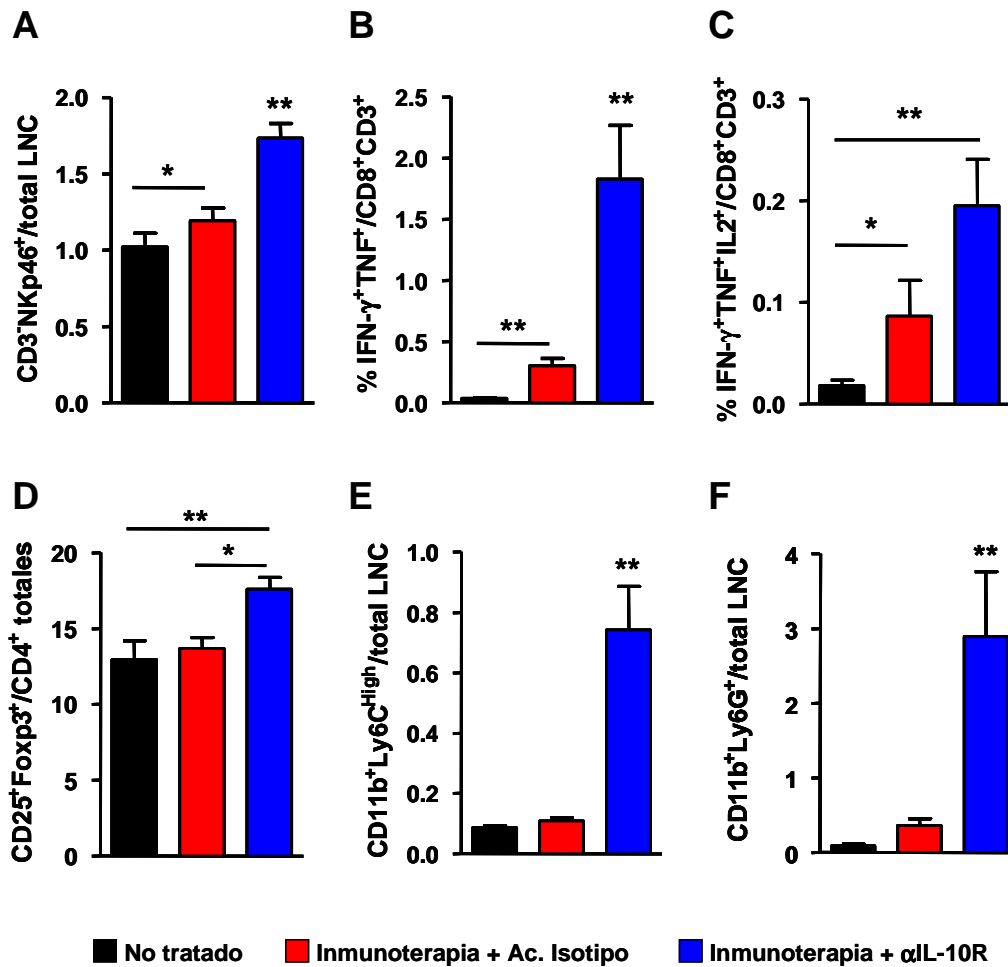


Figura R51. Activación de la inmunidad efectora y reguladora en los nódulos que drenan el tumor en ratones tratados con inmunoterapia y bloqueo de IL-10. En los mismos ratones de la **Figura R50**, se analizaron las respuestas inducidas en los nódulos drenantes del tumor mediante citometría de flujo. Se estudió el porcentaje de células NK (**A**), los LT CD8 productores de dobles (**B**) y triples (**C**) citoquinas tras estimulación con OVA(257-264). También se analizaron poblaciones inmunosupresoras como las Treg FoxP3⁺ (**D**) y células mieloides supresoras monocíticas (**E**) y granulocíticas (**F**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ IT + α IL10R vs Resto de grupos.

2.3. Combinación de EDA-OVA + MAC con el bloqueo de IL-10

Puesto que el bloqueo de IL-10 aumentaba de manera notable los efectos antitumorales cuando se combinaba con una vacunación basada en el antígeno

(OVA) y un único adyuvante (Imiquimod), nos planteamos la combinación del bloqueo de IL-10 con una inmunoterapia basada en el antígeno y una mezcla de adyuvantes (EDA-OVA + MAC), que ya habíamos demostrado que rechazaban un 50% de los tumores (**Figura R27**).

Al estimular las CD con adyuvantes, además de citoquinas proinflamatorias como IL-12, también se producen factores inmunoreguladores como IL-10. Por ello se comparó el balance de citoquinas producidas por las CD *in vitro* al estimularlas con Imiquimod o EDA + MAC. Los resultados mostraron que al estimular las CD con Imiquimod se inducían niveles similares de IL-12 e IL-10. Cuando las CD se incubaron con EDA + MAC, se observó un incremento de las dos citoquinas con respecto al Imiquimod, aunque el aumento relativo de los niveles de IL-12 fue superior al observado en los niveles de IL-10 (**Figura R52**).

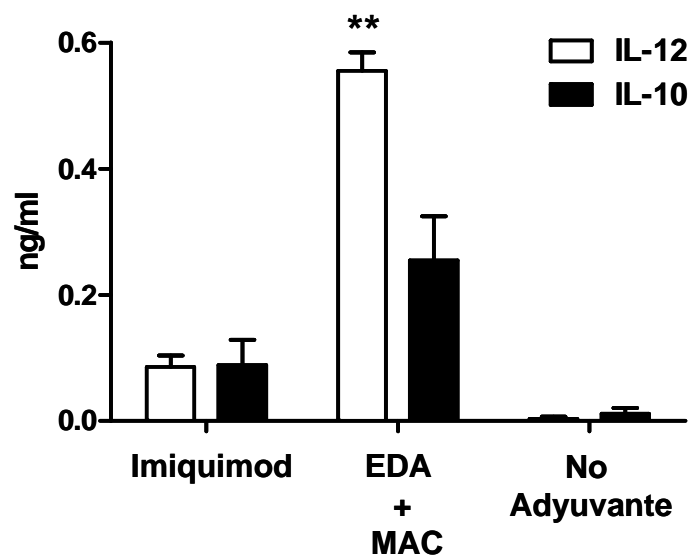


Figura R52. Relación de la producción de IL-12 e IL-10 en las CD estimuladas con adyuvantes *in vitro*. Las CD se cultivaron en presencia de las siguientes combinaciones de adyuvantes: Imiquimod (5 µg/ml), EDA (2 µM) + MAC (Imiquimod + anti-CD40 (50 µg/ml) + poly (I:C) (50 µg/ml)). Se utilizó como control un grupo sin adyuvantes. A las 24 horas se midió la producción de citoquinas IL-12 e IL-10 mediante ELISA. **, $p < 0,01$ IL-12 en EDA+MAC vs IL-12 en Resto de grupos.

Se realizó también un experimento equivalente *in vivo* en ratones con tumor, donde ya sabíamos que EDA-OVA + MAC aumentaba los niveles de IL-12 (**Figura R15A**). En este caso también se observó que en los tumores tratados, los niveles de IL-10 aumentaban cuando se administraba EDA-OVA + MAC (**Figura R53**).

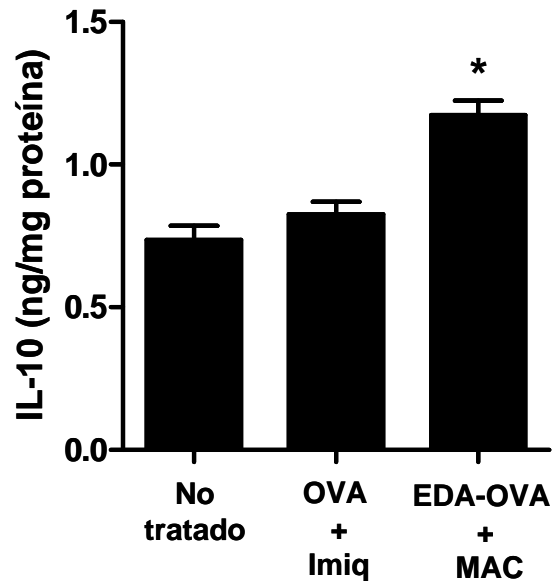


Figura R53. El tratamiento EDA-OVA + MAC aumenta los niveles de IL-10 en el tumor. Ratones con tumores de un diámetro de 8 mm ($n=3/\text{grupo}$) se trataron durante 1 semana con OVA + Imiquimod, EDA-OVA + MAC o se dejaron sin tratar. A los 7 días se sacrificaron los ratones y se extirparon los tumores para medir la IL-10 en el homogeneizado tumoral mediante ELISA. *, $p < 0,05$ EDA-OVA+MAC vs Resto de grupos.

2.3.1. Inmunidad adaptativa

Una vez demostrada la relevancia de IL-10 en la vacunación con EDA-OVA + MAC se analizó el efecto de su bloqueo en experimentos de vacunación en ratones sin tumor. Las respuestas inducidas tras la inmunización con EDA-OVA + MAC fueron las más potentes de entre todas las combinaciones que se habían estudiado con las diferentes combinaciones de adyuvantes. Sin embargo, cuando se combinaban con el bloqueo de IL-10 se indujeron respuestas aun más potentes ($p < 0,01$) (**Figura R54**).

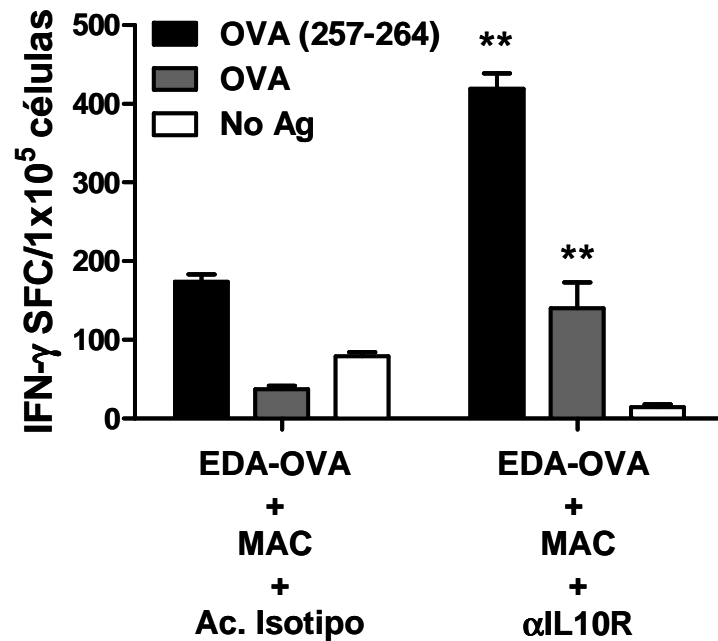


Figura R54. El bloqueo de IL-10 potencia las respuestas inducidas por EDA-OVA + MAC. Se inmunizaron ratones *naïve* C57BL/6 ($n=4/\text{grupo}$) con la inmunoterapia EDA-OVA + MAC + Ac. Isotipo o anti-IL10R. El séptimo día se sacrificaron los ratones y se estimularon sus esplenocitos con antígenos de OVA. La respuesta se cuantificó midiendo las células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT. **, $p < 0,01$ EDA-OVA + MAC + α IL-10R vs EDA-OVA + MAC + Ac. Isotipo.

Además del número de células productoras de IFN- γ mostrado en la **Figura R54**, también analizamos la avidéz de los linfocitos por el antígeno. Encontramos que la combinación de EDA-OVA + MAC junto con el bloqueo de IL-10 indujo un aumento de la avidéz sobre los valores observados en el grupo inmunizado con EDA-OVA + MAC. Así, a una concentración de 0,01 ng/mL de OVA(257-264) todavía seguían detectándose niveles de IFN- γ (**Figura R55**).

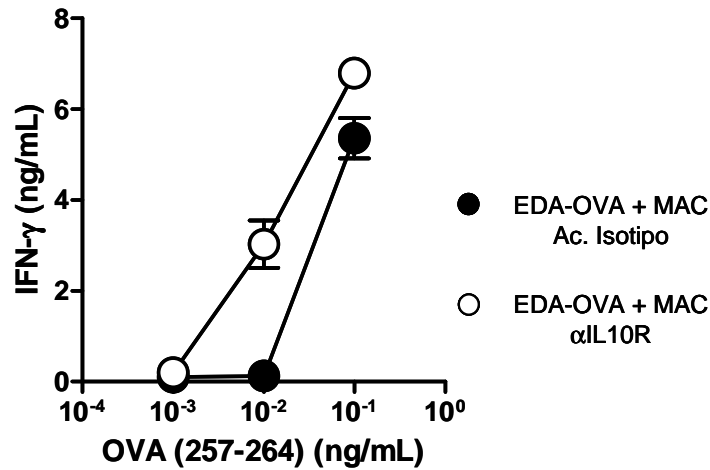


Figura R55. Avidéz de los LT CD8 inducidos. Los esplenocitos de los ratones utilizados en la **Figura R54** se estimularon con diferentes concentraciones de OVA(257-264). A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se midieron los niveles de IFN- γ mediante ELISA.

2.3.2. Tratamiento tumoral

Tras caracterizar la inmunidad adaptativa inducida por la combinación de EDA-OVA + MAC junto con el bloqueo de IL-10 estudiamos los efectos antitumorales inducidos por esta estrategia de inmunoterapia. Los resultados mostraron que la inmunoterapia con EDA-OVA + MAC + Ac. Isotipo reproducía los resultados que se mostraban con anterioridad. Cuando se bloqueaba IL-10, los tumores no sólo permanecieron sin crecer durante el periodo de tratamiento (**Figura R56A**) sino que se consiguió rechazar el 100% de los mismos (**Figura R56B**).

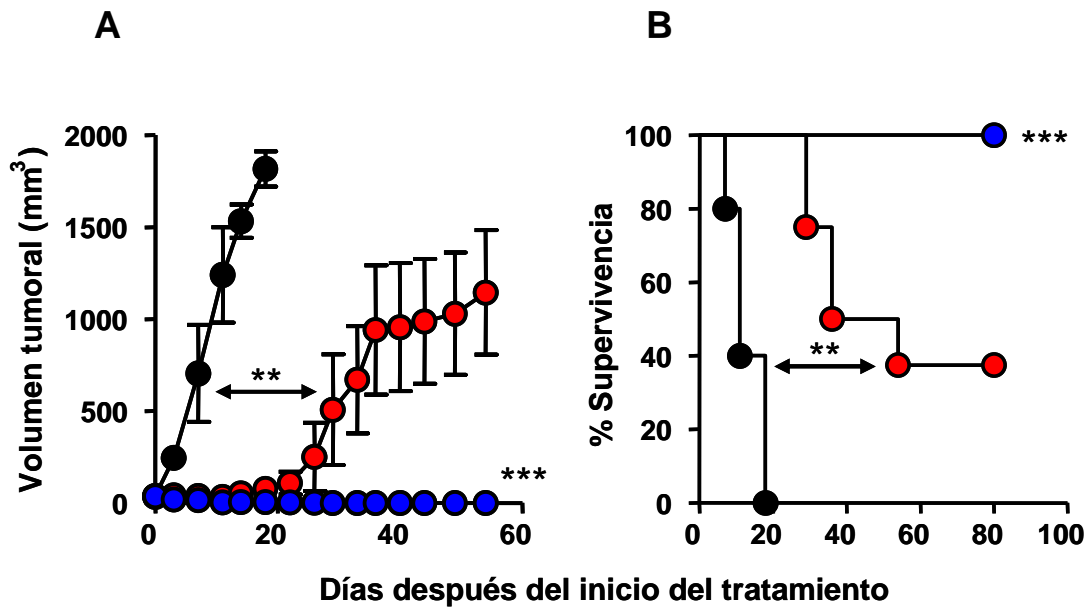


Figura R56. El tratamiento antitumoral EDA-OVA + MAC combinado con el bloqueo de IL-10 rechaza el 100% de los tumores B16-OVA. Se inocularon 10^5 células B16-OVA *i.d.* en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5 mm se distribuyeron los siguientes grupos: 1) No tratado ● ($n=6$); 2) Inmunoterapia (EDA-OVA + MAC) + Ac. Isotipo ● ($n=8$); Inmunoterapia (EDA-OVA + MAC) + anti-IL-10R ● ($n=8$). La inmunoterapia consistió en EDA-OVA + MAC (3 veces por semana *i.t.*), aplicando todos los días Imiquimod sobre el tumor). El Ac. Isotipo y el anti-IL10R, se administró una vez por semana ($500 \mu\text{g}/\text{ratón}$ *i.p.*). Los ratones fueron tratados durante un periodo de 20 días. Se midió el volumen tumoral cada 3 - 4 días (A) y la supervivencia (B). **, $p < 0,01$ IT+Ac. Isotipo vs NT; ***, $p < 0,001$ IT+ α IL10R vs Resto de grupos.

DISCUSIÓN

Actualmente, la inmunoterapia se presenta como una de las estrategias más seguras y prometedoras para combatir el cáncer junto a la cirugía, quimioterapia y radioterapia. A su favor se encuentra el hecho de ser menos agresiva, ser capaz de inducir respuestas específicas frente al tumor e inducir memoria a medio y largo plazo por medio de la inmunidad adaptativa, lo que podría reducir las recaídas tumorales en los pacientes.

Hasta la fecha, se han desarrollado muchos protocolos de inmunoterapia con el objetivo de inducir respuestas inmunitarias eficaces para destruir las células tumorales, algunos de los cuales han alcanzado las fases clínicas, como muestran algunas revisiones (Waldmann 2003; Rosenberg *et al.* 2004; Kirkwood *et al.* 2012). Sin embargo, el efecto de este tipo de terapias es muy limitado, ya que los tumores son poco inmunogénicos para las células T y a diferencia de las CD, éstos expresan bajos niveles de antígeno, MHC y moléculas co-estimuladoras. Además, las células tumorales carecen de señales de peligro asociadas a patógenos (PAMPs) o señales inflamatorias (citoquinas o expresión del CD40L), a menos que se induzcan mediante sesiones de radio o quimioterapia (Tesniere *et al.* 2008). Por lo tanto, para inducir una respuesta inmunitaria eficaz frente a tumores que escapan de la inmunovigilancia, es necesario algo más que los antígenos o las células tumorales.

Junto a la poca inmunogenicidad intrínseca de las células tumorales, se produce el hecho de que en muchos casos los tumores son detectados cuando se encuentran en un estadio avanzado, lo cual dificulta aún más la eficacia de la inmunoterapia. Esto es debido a que en estos estadios se ha generado un microambiente caracterizado por el reclutamiento de células reguladoras y los altos niveles de factores inmunosupresores, que originan un ambiente tolerogénico para el sistema inmunitario.

Estos antecedentes nos motivaron a desarrollar nuevas estrategias de inmunoterapia que permitieran mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales.

1. INMUNOTERAPIA BASADA EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN UN MODELO TUMORAL POCO INMUNOGÉNICO

Como se ha comentado anteriormente, la limitada inmunogenicidad de las células tumorales es una de las principales causas responsables del fracaso en las estrategias de inmunoterapia frente al cáncer. El reconocimiento de epítomos presentados en el contexto de moléculas de MHC en la superficie de las células tumorales podría conducir a la eliminación de estas células por la acción de mecanismos líticos o mediante citoquinas secretadas por los LT CD8 y CD4. Sin embargo, aunque los LT efectores puedan ser capaces de reconocer a las células tumorales, los LT *naïve* no pueden activarse al reconocer a las células tumorales, debido a la falta de señales de co-estímulo (Tesniere *et al.* 2008; Driessens *et al.* 2009). En este caso son las CD las que activan a los LT. Por ello, el desarrollo de estrategias que promuevan la correcta presentación de antígenos tumorales a los LT por parte de las CD se establece como un objetivo primordial en la inmunoterapia frente al cáncer.

Las proteínas recombinantes o los péptidos sintéticos, empleados como antígenos tumorales, normalmente son incapaces de inducir una fuerte respuesta inmunitaria celular, a menos que se combinen con adyuvantes que activen la inmunidad innata e induzcan la maduración de las CD (Kim *et al.* 1998). Por lo tanto, en el desarrollo de estrategias de inmunoterapia, resulta frecuente el uso de adyuvantes, lo que Janeway denominó como el “*pequeño y sucio secreto de los inmunólogos*” (Janeway 1989). Numerosos estudios han mostrado que la activación de los receptores TLR por los PAMPs son uno de los inductores de maduración de las CD *in vivo* más potentes, dando lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias y la sobreexpresión de moléculas de co-estímulo. Además, la interacción entre CD40 presente en las CD y CD40L expresado en los LT CD4 activados constituye una señal adicional que promueve la correcta maduración de estas CPA para su interacción con los LT CD8 (Grewal *et al.* 1998; Ridge *et al.* 1998; Schoenberger *et al.* 1998). Esta interacción ha sido destacada en estudios de inmunoterapia demostrando ser capaz de romper la tolerancia mediada por los tumores (Toes *et al.* 1998) y,

como consecuencia, tener efectos antitumorales con la simple administración de anticuerpos agonistas del CD40 (French *et al.* 1999). Además, Ahonen *et al.*, mostraron que la combinación de adyuvantes agonistas de TLR con el anticuerpo anti-CD40 tenía un efecto sinérgico en la activación de los LT CD8 (Ahonen *et al.* 2004). Así, esta estrategia favorece la captura antigénica y maduración de las CD, necesarias para una óptima activación de los LT (Ochsenbein *et al.* 2001; Ochsenbein 2002).

Uno de los principales obstáculos que presentan las estrategias de inmunoterapia cuando llegan a ensayos clínicos, es que el desarrollo preclínico de la terapia se ha realizado en modelos tumorales murinos, por lo general más inmunogénicos que los tumores humanos. Por ello, nos pareció más relevante desarrollar una estrategia de inmunoterapia en un modelo tumoral poco inmunogénico, simulando las dificultades que se pueden encontrar en los tumores humanos.

En primer lugar se caracterizó el modelo tumoral de melanoma B16-OVA. Para ello se aplicó a este modelo estrategias de inmunoterapia que fueron exitosas en otros modelos. Así, se utilizó una estrategia de vacunación que induce potentes respuestas celulares mediante una simple administración profiláctica del antígeno tumoral (OVA) junto los adyuvantes poly (I:C) (agonista de TLR3) y, anticuerpos agonistas de CD40. Las respuestas inducidas por esta vacuna protegieron al 100% de los ratones del crecimiento de tumores de timoma EG7-OVA, un tumor relativamente inmunogénico, pero no protegieron a ningún ratón del crecimiento del melanoma B16-OVA. El perfil poco inmunogénico de las células B16-OVA se confirmó al observar que presentaban bajos niveles de expresión de MHC-I y antígeno (OVA). De este modo, se nos presenta un modelo tumoral para desarrollar estrategias de inmunoterapia con aplicaciones potencialmente clínicas. Se han utilizado diferentes estrategias para el tratamiento de tumores B16. La mayoría se basan en CD pulsadas con antígenos o transducidas con vectores que codifican dichos antígenos (Boczkowski *et al.* 1996; Ashley *et al.* 1997; Bellone *et al.* 2000) o en inmunógenos complejos, como virus o bacterias recombinantes, así como partículas tipo virus (*virus-like particles*), todos ellos portadores de múltiples señales capaces de activar a las CD (Krishnan *et al.* 2003; Brinkman

et al. 2005; Shibata *et al.* 2006). Sin embargo, apenas existen ejemplos eficaces donde se hayan desarrollado estrategias antitumorales utilizando el modelo B16 donde se combinen adyuvantes y antígenos definidos (Ahonen *et al.* 2008; Wells *et al.* 2008; Stone *et al.* 2009).

Una vez escogido el modelo se diseñó una estrategia de inmunoterapia consistente en la administración únicamente de adyuvantes, ya que teníamos datos previos del modelo EG7-OVA donde este tipo de terapia inducía el rechazo de un 35% de los tumores debido a la inducción de inmunidad tanto innata como adaptativa (Llopiz *et al.* 2008). Para el tratamiento en B16-OVA, se sustituyó el adyuvante poly (I:C) por la crema Aldara™ (Imiquimod, agonista de TLR7), utilizada actualmente como adyuvante en ensayos clínicos de melanoma (Ellis *et al.* 2012). Sin embargo, la administración de adyuvantes no consiguió el rechazo tumoral, ya que esta inmunoterapia tan solo activó la respuesta innata. Quizás los bajos niveles de antígenos tumorales expresados y/o liberados por las células B16-OVA, potencialmente disponibles después de la activación de la inmunidad innata para ser presentados a los LT, no conseguían inducir la activación de la respuesta adaptativa. Esta hipótesis se corroboró con dos resultados: **i)** los ratones con tumores B16-OVA tratados únicamente con adyuvantes tenían inmunidad innata pero no inmunidad adaptativa frente a OVA (al contrario que los ratones con tumores EG7-OVA), y **ii)** los tumores B16-OVA presentaban un crecimiento lento durante el periodo de tratamiento, presumiblemente debido a la inmunidad innata fomentada por la administración de adyuvantes, pero tras finalizar este tratamiento se observó de nuevo progresión tumoral.

Como el efecto antitumoral observado tras la utilización de adyuvantes fue limitado, decidimos aportar exógenamente un antígeno tumoral, estrategia similar a la propuesta por Celis y colaboradores con el TriVax (Assudani *et al.* 2008; Cho *et al.* 2009). En nuestro caso, en lugar de un péptido DTc se utilizó como antígeno la proteína OVA. Esta estrategia tenía una eficacia del 100% en el rechazo de los tumores EG7-OVA (Llopiz *et al.* 2008), pero en el modelo B16-OVA no mostró eficacia, puesto que ningún ratón rechazó los tumores. En esta ocasión no se debió a una falta de activación de la inmunidad adaptativa, ya que se activaron LT específicos del tumor, no sólo en ratones *naïve* sino

también en ratones con tumor. Al contrario del protocolo basado en la administración de adyuvantes, al incluir antígeno se observó un retraso de unos 10 días en el crecimiento tumoral después de finalizar el tratamiento, lo que sugirió que, a pesar de inducir respuestas de células T, éstas no tenían efectos antitumorales lo suficientemente eficaces. Este tipo de resultados se observaron tanto al combinar OVA con Imiquimod y anti-CD40 como con poly (I:C) y anti-CD40. Por lo tanto el siguiente objetivo consistió en mejorar la inmunidad adaptativa.

Para mejorar la pobre eficacia antitumoral de estos protocolos, decidimos utilizar una múltiple combinación de adyuvantes que contenía Imiquimod, poly (I:C) y anti-CD40 (MAC), así como la proteína EDA fusionada al antígeno tumoral OVA. La estrategia de utilizar EDA fusionada a un antígeno tenía doble funcionalidad, ya que actúa como inmunoestimulador puesto que se une a TLR4 y, a su vez, como vehículo antigénico a las CPA. Trabajos previos habían mostrado que, tanto con OVA como con otros antígenos, su fusión a EDA aumenta su inmunogenicidad, y además podía combinarse con otros adyuvantes (Lasarte *et al.* 2007; Mansilla *et al.* 2009; Mansilla *et al.* 2011).

Esta nueva estrategia de inmunoterapia, EDA-OVA + MAC, consiguió rechazar el 50% de los tumores B16-OVA establecidos, asociada a una evidente mejoría en la respuesta antitumoral innata y adaptativa inducida. Las sinergias entre diferentes adyuvantes se han manifestado en ensayos con CD *in vitro* e *in vivo* (Ahonen *et al.* 2004; Napolitani *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2008), principalmente para aquellos receptores que no comparten vías de señalización. Por esta razón, nosotros utilizamos poly (I:C), que se une a TLR3 (Alexopoulou *et al.* 2001) y señala a través del adaptador TRIF; Imiquimod, que se une a TLR7, con MyD88 como molécula adaptadora (Hemmi *et al.* 2002); anti-CD40, que incluye la interacción de CD40 con varios miembros de la familia TRAF (Vidalain *et al.* 2000; Bishop *et al.* 2007), y EDA, ligando de TLR4, un receptor conectado a las vías de señalización TRIF y MyD88 (Yamamoto *et al.* 2003).

De acuerdo con esto, EDA + MAC indujo una sobreexpresión *in vitro* en CD de moléculas co-estimuladoras asociadas con la activación de LT, así como

de citoquinas. Además, tanto MAC como EDA + MAC fueron capaces de inducir altos niveles de activación en las CD en los ratones con tumor. Por otro lado, estos efectos no sólo se observaron en las CPA, que afectan de forma concomitante a las respuestas de los LT, sino también en las células NK, las cuáles pueden ayudar a la inducción de respuestas Th1, tal y como se ha mostrado en un modelo de citomegalovirus murino (Parker *et al.* 2007). Así comprobamos que con esta combinación de adyuvantes, las células NK eran parcialmente responsables de la activación de las células CD8 productoras de IFN- γ . Estos resultados, junto con el menor rechazo tumoral hallado en el tratamiento distal al tumor, sugieren la doble importancia del efecto de los adyuvantes, siendo necesarios no sólo localmente para rechazar el tumor tras la activación de la inmunidad innata con efectos directos inflamatorios y antitumorales, sino también por su colaboración con la activación de la inmunidad adaptativa (Zabaleta *et al.* 2007).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, aunque MAC fue capaz de inducir *in vivo* respuestas innatas similares, EDA-OVA + MAC activó fuertemente la respuesta de los LT. Probablemente uno de los responsables de este efecto fue la capacidad que presenta EDA, fusionada a OVA, como vehículo para el antígeno. Así comprobamos que EDA sin fusionar al antígeno OVA junto a MAC no era tan eficaz en la activación de respuestas mediadas por LT CD8. Por otra parte, EDA-OVA + MAC no sólo indujo una mayor cantidad de respuestas en los LT, sino que también mejoraba la calidad, parámetros que se reflejaron con la avidez y polifuncionalidad de los LT inducidos.

Por un lado, estudiamos la avidez de los LT CD8 por el antígeno, una cualidad relacionada con la eficacia antiviral (Alexander-Miller *et al.* 1996; Gallimore *et al.* 1998) y antitumoral (Yee *et al.* 1999; Zeh *et al.* 1999). Encontramos que los LT CD8 activados por EDA-OVA + MAC reconocían intensamente bajas concentraciones del DTc inmunodominante de OVA. La alta producción de IFN- γ inducida por estas bajas concentraciones de antígeno (una situación similar que se encuentra en los tumores poco inmunogénicos (Wells *et al.* 2008)) probablemente ayudaría a incrementar la expresión de moléculas de MHC-I en las células tumorales, tal y como ya se ha mostrado en ensayos *in vitro* (Cho *et al.* 1999) y así aumentar el reconocimiento por los LT

CD8. De este modo, la combinación EDA-OVA + MAC fue capaz de expandir LT que reconocían eficazmente a las células tumorales B16-OVA *in vitro*, y probablemente ésta sea una de las causas responsables del efecto antitumoral *in vivo*. En relación con estos resultados, Zhu Q, *et al.*, demostraron que la combinación de adyuvantes que contienen ligandos de TLR2/6, TLR3 y TLR9, mejora las cualidades de las respuestas en los LT aumentando la avidéz funcional en un modelo de protección viral (Zhu *et al.* 2010). Curiosamente, esta triple combinación, que sólo comparte el ligando de TLR3 con nuestra estrategia de inmunoterapia, también aumentó la expresión de IL-15 e IL-15R, una citoquina que interviene en la avidéz en los LT CD8 (Oh *et al.* 2004), sugiriendo por lo tanto que la inducción de esta citoquina por combinaciones de adyuvantes podría estar relacionada con su capacidad para activar LT de alta avidéz.

Finalmente, el análisis de la activación de LT CD8 polifuncionales (LT capaces de producir varias citoquinas simultáneamente y diferentes funciones efectoras) mostró que éstos se expandían más al estimularlos con bajas concentraciones de antígeno tras la administración de EDA-OVA + MAC. La polifuncionalidad de los linfocitos (Darrah *et al.* 2007; Kannanganat *et al.* 2007) es otro parámetro que también se encuentra asociado con el control de infecciones virales (Harari *et al.* 2004; Betts *et al.* 2006) y la regresión de tumores (Imai *et al.* 2009).

Estos parámetros asociados con el aumento de la respuesta de los LT (reflejados en los niveles de IFN- γ producidos), la inducción de LT de alta avidéz (que reconocen niveles escasos de antígeno expresado en las células tumorales) o la activación de células T polifuncionales, pueden explicar la mayor eficacia de la estrategia EDA-OVA + MAC utilizada en este trabajo.

Por último, los ratones curados con la inmunoterapia EDA-OVA + MAC, demostraron que no sólo estaban protegidos frente al tumor inicial, B16-OVA, sino que también un 80% de ellos estaban protegidos frente a un nuevo tumor que carecía del antígeno utilizado en la combinación de adyuvantes, la línea B16-F10. Este hecho sugirió que esta estrategia inducía LT frente a otros epítomos del tumor, un fenómeno conocido como “*epitope spreading*”,

fenómeno que recientemente se ha mostrado que contribuye a mejorar la eficacia en los tratamientos de metástasis en pacientes con melanoma (Hardwick *et al.* 2011). La inmunidad frente a otros antígenos tumorales no utilizados en la inmunización (principalmente TRP-2), se activaba con la administración de EDA-OVA + MAC, haciendo inmunogénicos estos antígenos tumorales, los cuales en ausencia de señales de activación, no activaban las respuestas de los LT. Así, esta estrategia tiene la ventaja adicional de inducir inmunidad protectora frente a antígenos tumorales desconocidos no utilizados en la vacunación terapéutica.

En resumen, en un tumor poco inmunogénico, que no responde frente a terapias basadas en la administración simple o doble de adyuvantes, se consiguió una potenciación de la respuesta inmunitaria utilizando la estrategia combinada de múltiples adyuvantes junto con la vehiculización del antígeno. Esta estrategia generó LT cuantitativa y cualitativamente superiores que resultaron tener un potente efecto antitumoral.

2. POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA MEDIANTE EL BLOQUEO DE CITOQUINAS INMUNOSUPRESORAS

El crecimiento tumoral o su rechazo por el sistema inmunitario dependen del balance entre mecanismos efectores antitumorales y mecanismos inmunosupresores derivados del ambiente tumoral. Por ello, desde hace años se han aplicado estrategias de inmunoterapia potenciadas con el bloqueo de mecanismos inmunosupresores, entre las que destacan ensayos clínicos con ejemplos como el ipilimumab y tremelimumab, anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 (Robert *et al.* 2009), o MDX-1106 (ONO-4538) y MDX-1105 (BMS-936559), anticuerpos bloqueantes de PD-1 (Brahmer *et al.* 2010) y PD-L1 (Zhang *et al.* 2009), respectivamente.

En nuestro estudio nos centramos en las citoquinas inmunosupresoras TGF- β e IL-10. Por un lado, se consideran citoquinas dianas para mejorar los efectos tanto antivirales como antitumorales, y por otro lado, en nuestro laboratorio se han desarrollado péptidos inhibidores del TGF- β e IL-10 con

resultados positivos mostrados en trabajos anteriores (Ezquerro *et al.* 2003; Santiago *et al.* 2005; Llopiz *et al.* 2009; Diaz-Valdes *et al.* 2011b). También consideramos como modelo tumoral el melanoma B16-OVA, ya que en la literatura (Seo *et al.* 2001; Garcia-Hernandez *et al.* 2002), como en datos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que estas dos citoquinas se encuentran implicadas en la tumorigenicidad de este modelo tumoral.

2.1. Bloqueo del TGF- β

Un aspecto crucial en la progresión tumoral es la propiedad que tiene TGF- β para desarrollar mecanismos de evasión a la respuesta inmunitaria (Maeda *et al.* 1995). De este modo, el TGF- β producido por el tumor, induce el desarrollo de mecanismos de escape mediante un aumento del perfil de citoquinas tipo Th2 y una disminución del tipo Th1, así como un efecto inmunosupresor a nivel de los LT CD4 (Tada *et al.* 1991) y CD8 (Inge *et al.* 1992), comprometiendo la respuesta citotóxica específica frente al tumor.

Estudios previos en nuestro grupo habían caracterizado los péptidos inhibidores de TGF- β P17 y P144 como moléculas capaces de unirse a diferentes isoformas de la citoquina y neutralizar su actividad biológica (Ezquerro *et al.* 2003; Santiago *et al.* 2005; Dotor *et al.* 2007; Gil-Guerrero *et al.* 2008). Por este motivo combinamos dichos inhibidores con diferentes formas de inmunoterapia. Observamos que la inmunoterapia basada en la administración de OVA más adyuvantes (poly (I:C) + anti-CD40) combinada con P144 potenciaba la inmunidad innata. Esto se debió a la inhibición del efecto de TGF- β sobre la función de las CD (Kobie *et al.* 2003; Ghiringhelli *et al.* 2005b) así como sobre la actividad antitumoral de las células NK (Witham *et al.* 2003). También observamos que esta estrategia aumentó la respuesta adaptativa, de acuerdo al papel de TGF- β como inhibidor de la expresión de algunos genes citolíticos producidos por los LT CD8, como el IFN- γ (Thomas *et al.* 2005). Todo esto se tradujo en un retraso en el crecimiento tumoral y una disminución en los niveles intratumorales de IL-10, citoquina dependiente de TGF- β .

En un trabajo previo, Llopiz D. *et al.* demostraron la eficacia antitumoral en el modelo EG7-OVA de la combinación de la inmunoterapia con los péptidos inhibidores de TGF- β , P17 y P144 (Llopiz *et al.* 2009). Demostraron que la administración de los adyuvantes y la inhibición de TGF- β tenían que ser simultáneas, que los péptidos inhibidores sólo no tenían ningún efecto y que la administración conjunta de P17 y P144 potenciaba más el efecto antitumoral que la administración de los péptidos por separado. En ese modelo, la inhibición de TGF- β no afectaba directamente a la disminución del número de células reguladoras fuentes de esta citoquina, como las Treg o MDSC, pero sí inactivaba indirectamente el efecto de estas células, inhibiendo el TGF- β que producen. En el caso de los tumores B16-OVA, los péptidos inhibidores de TGF- β potenciaban la inmunoterapia basada en la administración de Imiquimod, reflejado en un retraso del crecimiento tumoral tan sólo durante el periodo de tratamiento.

2.2. Bloqueo de IL-10

Junto a los efectos de la inhibición de TGF- β , también estudiamos la relevancia de la inhibición de IL-10 en la inmunoterapia tumoral. IL-10 está considerada como una citoquina anti-inflamatoria que juega un papel crucial en el sistema inmunitario, y además, se encuentra asociada a la tolerancia que presentan las infecciones crónicas y los tumores, ejerciendo un fuerte papel inmunosupresor (Salazar-Onfray 1999). De este modo, los niveles séricos de esta citoquina se encuentran aumentados en los pacientes con cáncer (Dummer *et al.* 1995; Sato *et al.* 1996), algo que también observamos en los ratones con tumores B16-OVA. Además de la IL-10 producida como consecuencia del tumor, la inmunoterapia basada en la administración de Imiquimod también indujo la producción de esta citoquina, fenómeno que se detectó al analizar sus niveles séricos. Estos resultados concuerdan con datos de la literatura que muestran que al activar las CPA con PAMPs, éstas expresan IL-10 tanto *in vitro* (Edwards *et al.* 2002; Boonstra *et al.* 2006) como *in vivo* (Akbari *et al.* 2001; McGuirk *et al.* 2002). Referente a esto, Seder y colaboradores han sugerido que la IL-10 inducida por las CD durante la inmunoterapia es la que modula la respuesta Th1, explicando la importancia que

tiene bloquear la IL-10 según de la plataforma de vacunación que se utilice (Darrah *et al.* 2007; Darrah *et al.* 2010). En nuestro caso, observamos que el bloqueo de IL-10 al emplear adyuvantes agonistas de TLR que señalizan a través de MyD88, (Imiquimod (TLR7), CpG (TLR9) y EDA (TLR4)), aumentó la respuesta de los LT CD8. Sin embargo, esto no ocurrió al utilizar el adyuvante poly I:C (TLR3), que señala a través de TRIF. Resultados similares con algunos ligandos de TLR se han mostrado utilizando CD humanas derivadas de monocitos (Bogunovic *et al.* 2011). Se ha descrito que IL-10 induce la ubiquitinación y degradación de moléculas asociadas a la vía de MyD88, produciendo tolerancia en las CD (Chang *et al.* 2009), lo que podría explicar el efecto selectivo del bloqueo de esta citoquina en determinadas situaciones. De este modo, puesto que nuestra estrategia de inmunoterapia se basa en la administración de Imiquimod, la relevancia de inhibir la IL-10 es doble, ya que además de inhibir la citoquina sobreexpresada por el tumor es necesario inhibir la inducida por el tratamiento.

Experimentos realizados *in vivo* mostraron que la actividad de los péptidos inhibidores de IL-10, P9 y P13, era limitada. La alta expresión de IL-10 frente a la corta vida media y la escasa biodisponibilidad de los péptidos para ejercer su actividad podrían ser responsables de estos resultados. Aun así, la combinación de P9 con inmunoterapia mostró un cierto efecto antitumoral, que se asociaba a una potenciación de la inmunidad innata y adaptativa. Con objeto de analizar el potencial terapéutico del bloqueo de IL-10 también se utilizaron anticuerpos bloqueantes que ya habían demostrado su efecto en otros modelos infecciosos y tumorales (Vicari *et al.* 2004; Ejrnaes *et al.* 2006). Aunque no pueden ser del todo comparables, ya que los péptidos se unen a la citoquina y el anticuerpo se une al receptor de IL10, el bloqueo con el anticuerpo potenció aún más las respuestas que al utilizar el péptido P9. Aunque la mayor vida media en el organismo de los anticuerpos frente a los péptidos podría tener efectos secundarios más prolongados, en nuestro caso no apreciamos efectos contraproducentes en los ratones tratados con anticuerpo anti IL-10R, al igual que en otros trabajos (Ishida *et al.* 1994).

Utilizando esta estrategia demostramos que la combinación de inmunoterapia (antígeno OVA + Imiquimod) junto con el bloqueo del receptor

de IL-10, aumenta la inmunidad innata y la cantidad y calidad de la inmunidad adaptativa, no debiéndose a un efecto directo sobre la fase efectora de los LT CD8, sino presumiblemente a un efecto en la capacidad presentadora de las CD. Sorprendentemente, también aumentó el número de células reguladoras, como las Treg o MDSC. Esto puede ser debido a un efecto rebote producido por un exceso de citoquinas proinflamatorias que promueven la proliferación de poblaciones reguladoras. Aún así, la terapia mostró tener una gran eficacia en el tratamiento de tumores, rechazando el 30% y siendo, en este modelo tumoral y con esta estrategia de inmunoterapia, el bloqueo de IL-10 más eficaz que el bloqueo de TGF- β . Conclusiones similares se obtuvieron por Lu H. *et al*, en un modelo de tumor espontáneo de mama. En este trabajo argumentan que el tratamiento con Imiquimod produce un efecto de retroalimentación en la auto-regulación, induciendo la producción de grandes cantidades de IL-10 que es necesario bloquear para observar los efectos antitumorales que presenta la vía TLR7 (Lu *et al.* 2010). No obstante, existen controversias en este sentido, ya que en otro trabajo muestran que el Imiquimod reduce la población FoxP3 y la expresión de las citoquinas IL-10 y TGF- β de las Treg en las lesiones tratadas (Clark *et al.* 2008). Por lo tanto, todo parece indicar que los resultados dependen de las condiciones y modelos estudiados.

Finalmente, puesto que los efectos antitumorales se mejoran: **i)** por un lado potenciando la respuesta inmunitaria, y **ii)** por otro bloqueando los factores inmunosupresores, quisimos comprobar los resultados de la combinación de ambas estrategias. Recientemente Berzofsky ha planteado la llamada estrategia “*push-pull*” (Berzofsky *et al.* 2012), que consiste en la potenciación de la respuesta inmunitaria, “*push*”, junto con estrategias que bloqueen el ambiente inmunosupresor, “*pull*”. (**Figura D1**).

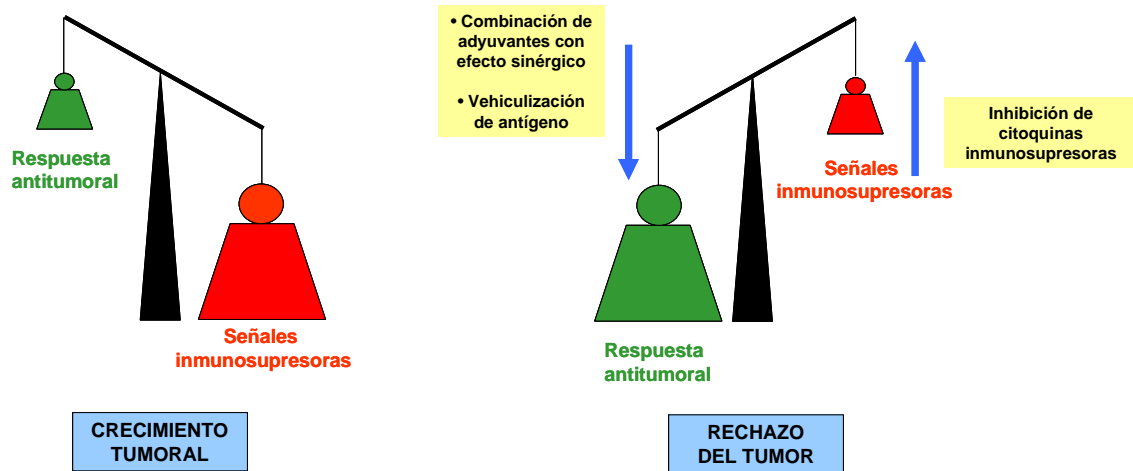


Figura D1. Estrategia para mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral.

Este tipo de estrategias se presentan actualmente como las más prometedoras en la inmunoterapia del cáncer. En nuestro caso, combinando EDA-OVA + MAC con anti-IL-10R, conseguimos rechazar el 100% de los tumores B16-OVA. Las respuestas inducidas fueron mayores, ya que el bloqueo de las grandes cantidades de IL-10 inducidas por la inmunoterapia permitía aumentar aún más el efecto inmunopotenciador del MAC. Como dato representativo de las respuestas tan potentes que inducía este tratamiento, todos los ratones mostraron vitíligo en la zona dónde se eliminó el tumor, probablemente producido por los LTc frente a antígenos de los melanocitos. Este es un hecho bastante frecuente que muestra la eficacia del tratamiento en modelos preclínicos y en pacientes con melanoma (Restifo *et al.* 1999).

A modo de sinopsis, en este trabajo hemos sido capaces de diseñar una estrategia de inmunoterapia eficaz en la erradicación de tumores en ratón con características similares a los tumores de pacientes. Por lo tanto, esta estrategia de inmunoterapia se podría utilizar para el desarrollo de vacunas, no solo antitumorales, sino frente a agentes infecciosos poco inmunogénicos que presenten mecanismos inmunosupresores equivalentes para escapar de la respuesta inmunitaria.

CONCLUSIONES

- 1) Las células tumorales B16-OVA son un buen modelo para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia con potencial aplicación clínica frente a tumores poco inmunogénicos.
- 2) El tratamiento de ratones con tumores B16-OVA mediante la administración de un adyuvante agonista de TLR y anticuerpos agonistas de CD40, activa la inmunidad innata pero no la inmunidad adaptativa.
- 3) En el modelo de ratones con tumores B16-OVA, cuando la inmunoterapia combina un adyuvante agonista de TLR, anticuerpos agonistas de CD40 y antígeno tumoral exógeno, sólo se retrasa el crecimiento tumoral, mientras que si incluye una combinación múltiple de adyuvantes (MAC) + EDA-OVA, se rechazan el 50% de los tumores. Este fenómeno está asociado a la inducción de inmunidad innata y adaptativa más potente.
- 4) Las respuestas inducidas mediante la inmunoterapia EDA-OVA + MAC son cuantitativa y cualitativamente mejores e incluyen el reconocimiento de otros antígenos tumorales no utilizados en la vacunación.
- 5) El bloqueo de TGF- β mediante los péptidos inhibidores P144 y P17, aumenta el efecto antitumoral de diferentes tipos de inmunoterapia, asociado a la inducción de una mayor respuesta de linfocitos T en el modelo B16-OVA.
- 6) El bloqueo de IL-10 con el péptido inhibidor P9 o con anticuerpos neutralizantes, en combinación con la inmunoterapia basada en la administración de antígeno y un adyuvante adecuado, potencia la respuesta inmunitaria, lo que resulta en el rechazo del 30% de los tumores B16-OVA.
- 7) La estrategia de inmunoterapia basada en la combinación de vacunación terapéutica con EDA-OVA + MAC junto con el bloqueo con anti-IL10R es capaz de inducir el rechazo del 100% de los tumores B16-OVA, asociado a una respuesta antitumoral más potente.

8) La combinación de estrategias que potencien la respuesta inmunitaria (como la vacunación con EDA-antígeno + MAC) junto al bloqueo de citoquinas inmunosupresoras (como TGF- β o IL-10) podría considerarse como una nueva opción terapéutica para el tratamiento de tumores poco inmunogénicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787-93.
- Aderem A and Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797):782-7.
- Ahmed R and Gray D. 1996. Immunological memory and protective immunity: Understanding their relation. *Science* 272(5258):54-60.
- Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM, Riter TR, Wade WF, Barth RJ, Vasilakos JP, Noelle RJ, Kedi RM. 2004. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med* 199(6):775-84.
- Ahonen CL, Wasiuk A, Fuse S, Turk MJ, Ernstoff MS, Suriawinata AA, Gorham JD, Kedi RM, Usherwood EJ, Noelle RJ. 2008. Enhanced efficacy and reduced toxicity of multifactorial adjuvants compared with unitary adjuvants as cancer vaccines. *Blood* 111(6):3116-25.
- Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2(8):725-31.
- Akira S. 2011. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1579):2748-55.
- Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4102-7.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857):732-8.
- Alpan RS, Zhang M, Pardee AB. 1996. Cell cycle-dependent expression of TAP1, TAP2, and HLA-B27 messenger RNAs in a human breast cancer cell line. *Cancer Res* 56(19):4358-61.
- Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29(3):325-42.
- Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA, Onoe K. 1993. NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol* 23(1):307-10.
- Arase H, Arase N, Kobayashi Y, Nishimura Y, Yonehara S, Onoe K. 1994. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact fas antigen expression on the target. *J Exp Med* 180(2):423-32.
- Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT. 1993. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 92(6):2569-76.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55(2):241-69.

- Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. 1997. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 186(7):1177-82.
- Assudani D, Cho HI, DeVito N, Bradley N, Celis E. 2008. In vivo expansion, persistence, and function of peptide vaccine-induced CD8 T cells occur independently of CD4 T cells. *Cancer Res* 68(23):9892-9.
- Bachmann MF, Zinkernagel RM, Oxenius A. 1998. Immune responses in the absence of costimulation: Viruses know the trick. *J Immunol* 161(11):5791-4.
- Banchereau J and Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-52.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Banchereau J and Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5(4):296-306.
- Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espindola NM, Vaz AJ, Soares IS, Ferreira LC, Rodrigues MM. 2008. New malaria vaccine candidates based on the plasmodium vivax merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist salmonella typhimurium FliC flagellin. *Vaccine* 26(48):6132-42.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. 2006. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 126(1):15-24.
- Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. 1999. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 155(2):537-47.
- Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, Crosti MC, Ronchetti A, Moro M, Garancini MP, Casorati G, Dellabona P. 2000. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 165(5):2651-6.
- Belmonte L, Parodi C, Bare P, Baston M, Bracco MM, Ruibal-Ares B. 2007. The role of dendritic cells in the infection by HIV and HCV. *Medicina (B Aires)* 67(1):63-70.
- Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263(5154):1774-8.
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: Development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15:535-62.
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, *et al.* 1998. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52(6):520-9.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393(6684):478-80.
- Berzofsky JA, Terabe M, Wood LV. 2012. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. *Semin Oncol* 39(3):348-57.

- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, *et al.* 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107(12):4781-9.
- Beutler B. 2004. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature* 430(6996):257-63.
- Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol* 597:131-51.
- Blauvelt A. 2008. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *J Invest Dermatol* 128(5):1064-7.
- Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. 1994. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: Differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):2890-4.
- Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. 1996. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 184(2):465-72.
- Bogunovic D, Manches O, Godefroy E, Yewdall A, Gallois A, Salazar AM, Marie I, Levy DE, Bhardwaj N. 2011. TLR4 engagement during TLR3-induced proinflammatory signaling in dendritic cells promotes IL-10-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Res* 71(16):5467-76.
- Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. 2010. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in human papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol* 11:27.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199(6):815-24.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, *et al.* 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177(11):7551-8.
- Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A. 2004. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells. *Mol Immunol* 41(6-7):569-75.
- Bourgeois C, Veiga-Fernandes H, Joret AM, Rocha B, Tanchot C. 2002. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur J Immunol* 32(8):2199-207.
- Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, *et al.* 2010. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28(19):3167-75.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, *et al.* 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26):2455-65.

- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JL, Phillips JH, *et al.* 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391(6669):795-9.
- Brinkman M, Walter J, Grein S, Thies MJ, Schulz TW, Herrmann M, Reiser CO, Hess J. 2005. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 54(6):611-22.
- Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP. 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: Induction of a suppressive population of mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 161(10):5313-20.
- Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. 2003. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 24(6):302-6.
- Bronte V and Zanovello P. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5(8):641-54.
- Burdin N, Brossay L, Koezuka Y, Smiley ST, Grusby MJ, Gui M, Taniguchi M, Hayakawa K, Kronenberg M. 1998. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: Alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* 161(7):3271-81.
- Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F. 1996. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 50(2):127-34.
- Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 1998. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 52(2):114-23.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. 2007. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132(4):1359-74.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184(2):747-52.
- Chang HL, Gillett N, Figari I, Lopez AR, Palladino MA, Derynck R. 1993. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of meth A sarcoma cells. *Cancer Res* 53(18):4391-8.
- Chang J, Kunkel SL, Chang CH. 2009. Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(43):18327-32.
- Chaux P, Favre N, Martin M, Martin F. 1997. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer* 72(4):619-24.
- Chen K, Huang J, Liu Y, Gong W, Cui Y, Wang JM. 2009. Synergy of TRIF-dependent TLR3 and MyD88-dependent TLR7 in up-regulating expression of mouse FPR2, a promiscuous G-protein-coupled receptor, in microglial cells. *J Neuroimmunol* 213(1-2):69-77.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12):1875-86.

- Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166(5):1229-44.
- Cho CH, Lee BK, Kwak SM, Kim JD. 1999. Monophosphoryl lipid A (MPL) upregulates major histocompatibility complex (MHC) class I expression by increasing interferon-gamma (IFN-gamma). *Yonsei Med J* 40(1):20-5.
- Cho HI and Celis E. 2009. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects. *Cancer Res* 69(23):9012-9.
- Chuang CM, Monie A, Hung CF, Wu TC. 2010. Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination. *J Biomed Sci* 17:32.
- Clark RA, Huang SJ, Murphy GF, Mollet IG, Hijnen D, Muthukuru M, Schanbacher CF, Edwards V, Miller DM, Kim JE, *et al.* 2008. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med* 205(10):2221-34.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5(12):1219-26.
- Condeelis J and Pollard JW. 2006. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124(2):263-6.
- Coussens LM and Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-7.
- Cretu A and Brooks PC. 2007. Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: Potential therapeutic and imaging opportunities. *J Cell Physiol* 213(2):391-402.
- Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* 202(9):1279-88.
- Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J. 2004. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect Immun* 72(5):2810-6.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, *et al.* 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9):942-9.
- Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. 2010. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9):4275-80.
- Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn C, Ensink NG, Tollenaar RA, *et al.* 2004. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 53(11):978-86.
- Dao T, Mehal WZ, Crispe IN. 1998. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol* 161(5):2217-22.

- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, *et al.* 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against leishmania major. *Nat Med* 13(7):843-50.
- Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RW, Chen L, Roederer M, Seder RA. 2010. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J Exp Med* 207(7):1421-33.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29(2):117-29.
- de Vries TJ, Trancikova D, Ruiter DJ, van Muijen GN. 1998. High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma. *Br J Cancer* 78(9):1156-61.
- Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintans J, Loken MR, Pierres M, Fitch FW. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human leu-3/T4 molecule. *J Immunol* 131(5):2445-51.
- Diaz-Valdes, N., Basagoiti, M., Dotor, J., Aranda, F., Monreal, I., Riezu-Boj, J. I., *et al.* 2011a. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 by TGFbeta1 in melanoma enhances tumor infiltration and immunosuppression. *Cancer Research*, 71(3), 812-821.
- Diaz-Valdes N, Manterola L, Belsue V, Riezu-Boj JI, Larrea E, Echeverria I, Llopiz D, Lopez-Sagaseta J, Lerat H, Pawlotsky JM, *et al.* 2011b. Improved dendritic cell-based immunization against hepatitis C virus using peptide inhibitors of interleukin 10. *Hepatology* 53(1):23-31.
- Dotor J, Lopez-Vazquez AB, Lasarte JJ, Sarobe P, Garcia-Granero M, Riezu-Boj JI, Martinez A, Feijoo E, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, *et al.* 2007. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* 39(2):106-15.
- Driessens G, Kline J, Gajewski TF. 2009. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229(1):126-44.
- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB. 1995. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 5(1):67-8.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11):991-8.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004a. The three es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-60.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004b. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2):137-48.
- D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S. 1991. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 87(1):284-92.

- Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. 2002. Microbial recognition via toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169(7):3652-60.
- Ejraes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG. 2006. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med* 203(11):2461-72.
- Ellis LZ, Cohen JL, High W, Stewart L. 2012. Melanoma in situ treated successfully using imiquimod after nonclearance with surgery: Review of the literature. *Dermatol Surg* 38(6):937-46.
- Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. 1997. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73(3):309-16.
- Eyler CE, Wu Q, Yan K, MacSwords JM, Chandler-Militello D, Misuraca KL, Lathia JD, Forrester MT, Lee J, Stamler JS, *et al.* 2011. Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* 146(1):53-66.
- Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortazar I, Bustos M, Penuelas I, Blanco G, Rodriguez C, Lechuga Mdel C, Greenwel P, *et al.* 2003. A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* 22(1-2):12-20.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(12):1206-12.
- Fayolle C, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant bordetella pertussis adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol* 162(7):4157-62.
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Munz C. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172(3):1455-62.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5(4):405-11.
- Ferrone S and Marincola FM. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: Molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16(10):487-94.
- Fidler IJ. 1975. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 35(1):218-24.
- Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL. 1989. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 143(2):518-25.
- Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, Braga M. 1996. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett* 104(1):1-5.
- Frazer IH. 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4(1):46-54.

- Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G. 1993. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* 178(6):2185-92.
- French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. 1999. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 5(5):548-53.
- Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. 1995. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(5):549-54.
- Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 166(9):5398-406.
- Gabrilovich DI and Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(3):162-74.
- Gallimore A, Dumrese T, Hengartner H, Zinkernagel RM, Rammensee HG. 1998. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J Exp Med* 187(10):1647-57.
- Garcia-Hernandez ML, Hernandez-Pando R, Gariglio P, Berumen J. 2002. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 105(2):231-43.
- Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. 2004. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 172(10):6065-73.
- Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, *et al.* 2005a. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202(8):1075-85.
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. 2005b. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202(7):919-29.
- Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, Lopez-Vazquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, *et al.* 2008. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J Immunol* 181(1):126-35.
- Gil-Torregrosa BC, Raul Castano A, Del Val M. 1998. Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-golgi network protease furin. *J Exp Med* 188(6):1105-16.
- Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F, Iolascon A. 2003. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem* 49(10):1664-7.
- Godfrey DI and Berzins SP. 2007. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 7(7):505-18.
- Gorelik L and Flavell RA. 2002. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2(1):46-53.

- Grewal IS and Flavell RA. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153:85-106.
- Grewal IS and Flavell RA. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111-35.
- Guernonprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, Leclerc C. 2001. The adenylate cyclase toxin of bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193(9):1035-44.
- Guia S, Cognet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, Filipe-Santos O, Feinberg J, Camcioglu Y, Levy J, *et al.* 2008. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood* 111(10):5008-16.
- Guy B. 2007. The perfect mix: Recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 5(7):505-17.
- Hallermalm K, Seki K, De Geer A, Motyka B, Bleackley RC, Jager MJ, Froelich CJ, Kiessling R, Levitsky V, Levitskaya J. 2008. Modulation of the tumor cell phenotype by IFN-gamma results in resistance of uveal melanoma cells to granule-mediated lysis by cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 180(6):3766-74.
- Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. 2004. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: Changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103(3):966-72.
- Hardwick N and Chain B. 2011. Epitope spreading contributes to effective immunotherapy in metastatic melanoma patients. *Immunotherapy* 3(6):731-3.
- Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63(19):6478-87.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18:275-308.
- Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL. 1993. Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem* 268(7):5077-84.
- Heath WR and Carbone FR. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1(2):126-34.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3(2):196-200.
- Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol* 172(7):4630-6.
- Hilders CG, Houbiers JG, Krul EJ, Fleuren GJ. 1994. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol* 101(1):5-12.

- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, *et al.* 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8):711-23.
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66(2):1123-31.
- Huang X, Zhu J, Yang Y. 2005. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+ CD25+ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 175(7):4283-91.
- Imai N, Ikeda H, Tawara I, Shiku H. 2009. Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 39(1):241-53.
- Inge TH, Hoover SK, Susskind BM, Barrett SK, Bear HD. 1992. Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52(6):1386-92.
- Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. 1994. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 179(1):305-10.
- Ishida T, Oyama T, Carbone DP, Gabilovich DI. 1998. Defective function of langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol* 161(9):4842-51.
- Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, Kiso S, Yabuuchi I, Matsuda Y, Nishioka M, Tarui S. 1991. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 51(15):4080-3.
- Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13.
- Janeway CA, Jr and Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421(6925):852-6.
- Jensen PE. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8(10):1041-8.
- Kaisho T and Akira S. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589(1):1-13.
- Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. 2007. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 81(16):8468-76.
- Kao J, Ko EC, Eisenstein S, Sikora AG, Fu S, Chen SH. 2011. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* 77(1):12-9.

- Karnezis T, Shayan R, Caesar C, Roufail S, Harris NC, Ardipradja K, Zhang YF, Williams SP, Farnsworth RH, Chai MG, *et al.* 2012. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell* 21(2):181-95.
- Katsikis PD, Cohen SB, Murison JG, Uren J, Hibbart LM, Callard RE, Di Padova F, Feldmann M, Londei M. 1995. Human alpha beta T-cell receptor CD4-CD8 T-cell clones are predominantly Th0-like. *Immunology* 84(4):501-4.
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, *et al.* 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278(5343):1626-9.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. 1986. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 137(12):3855-60.
- Kekow J, Wachsmann W, McCutchan JA, Cronin M, Carson DA, Lotz M. 1990. Transforming growth factor beta and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21):8321-5.
- Kim IY, Kim MM, Kim SJ. 2005. Transforming growth factor-beta : Biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol* 38(1):1-8.
- Kim SK, Reed DS, Olson S, Schnell MJ, Rose JK, Morton PA, Lefrancois L. 1998. Generation of mucosal cytotoxic T cells against soluble protein by tissue-specific environmental and costimulatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10814-9.
- Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. 2012. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* .
- Kline JN and Krieg AM. 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect* 21(8):434-9.
- Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaga CL, Akporiaye ET. 2003. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 63(8):1860-4.
- Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: Upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 184(2):741-6.
- Koschella M, Voehringer D, Pircher H. 2004. CD40 ligation in vivo induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells. *J Immunol* 172(8):4804-11.
- Krishnan L, Sad S, Patel GB, Spratt GD. 2003. Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer Res* 63(10):2526-34.
- Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, *et al.* 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 203(4):871-81.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388(4):621-5.

- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1):16-34.
- Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. 2005. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 175(7):4583-92.
- Lantz O and Bendelac A. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180(3):1097-106.
- Lanzavecchia A. 1998. Immunology. licence to kill. *Nature* 393(6684):413-4.
- Lasarte JJ, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F. 1995. In vivo cytotoxic T-lymphocyte induction may take place via CD8 T helper lymphocytes. *Res Immunol* 146(1):35-44.
- Lasarte JJ, Casares N, Gorraiz M, Hervas-Stubbs S, Arribillaga L, Mansilla C, Durantez M, Llopiz D, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, *et al.* 2007. The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. *J Immunol* 178(2):748-56.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
- Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH. 2004. Role of immature myeloid gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Res* 64(3):1130-9.
- Liakou CI, Narayanan S, Ng Tang D, Logothetis CJ, Sharma P. 2007. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immun* 7:10.
- Linsley PS and Ledbetter JA. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11:191-212.
- Liu YJ. 2005. IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23:275-306.
- Llopiz D, Dotor J, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. 2008. Combined immunization with adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 57(1):19-29.
- Llopiz D, Dotor J, Casares N, Bezunartea J, Diaz-Valdes N, Ruiz M, Aranda F, Berraondo P, Prieto J, Lasarte JJ, *et al.* 2009. Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int J Cancer* 125(11):2614-23.
- Lu H, Wagner WM, Gad E, Yang Y, Duan H, Amon LM, Van Denend N, Larson ER, Chang A, Tufvesson H, *et al.* 2010. Treatment failure of a TLR-7 agonist occurs due to self-regulation of acute inflammation and can be overcome by IL-10 blockade. *J Immunol* 184(9):5360-7.
- Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26(4):503-17.
- MacDonald HR. 1995. NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: New clues to their origin, specificity, and function. *J Exp Med* 182(3):633-8.

- Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. 1995. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J Immunol* 155(10):4926-32.
- Maghazachi AA. 2010. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 341:37-58.
- Maloy KJ and Powrie F. 2005. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ treg cells fit. *Nat Immunol* 6(11):1071-2.
- Mansilla C, Gorraiz M, Martinez M, Casares N, Arribillaga L, Rudilla F, Echeverria I, Riezu-Boj JI, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, *et al.* 2009. Immunization against hepatitis C virus with a fusion protein containing the extra domain A from fibronectin and the hepatitis C virus NS3 protein. *J Hepatol* 51(3):520-7.
- Mansilla C, Berraondo P, Durantez M, Martinez M, Casares N, Arribillaga L, Rudilla F, Fioravanti J, Lozano T, Villanueva L, *et al.* 2011. Eradication of large tumors expressing human papillomavirus E7 protein by therapeutic vaccination with E7 fused to the extra domain a from fibronectin. *Int J Cancer* .
- Mantovani A, Sica A, Locati M. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23(4):344-6.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: Molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273.
- Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B. 2000. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165(11):6047-55.
- Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
- McGuirk P, McCann C, Mills KH. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: A novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by bordetella pertussis. *J Exp Med* 195(2):221-31.
- McHeyzer-Williams M, McHeyzer-Williams L, Panus J, Pogue-Caley R, Bikah G, Driver D, Eisenbraun M. 2003. Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes Infect* 5(3):205-12.
- McMichael AJ. 1979. Lymphocytes. 1. function. genetic restrictions in the immune response. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 13:30-8.
- McMichael AJ. 1980. HLA restriction of human cytotoxic T cells. *Springer Semin Immunopathol* 3(1):3-22.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2):135-45.
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164):819-26.
- Mellman I. 2005. Antigen processing and presentation by dendritic cells: Cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 560:63-7.

- Mellor AL and Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4(10):762-74.
- Mitsui J, Nishikawa H, Muraoka D, Wang L, Noguchi T, Sato E, Kondo S, Allison JP, Sakaguchi S, Old LJ, *et al.* 2010. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 16(10):2781-91.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-223.
- Moron G, Rueda P, Casal I, Leclerc C. 2002. CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* 195(10):1233-45.
- Mortier E, Advincula R, Kim L, Chmura S, Barrera J, Reizis B, Malynn BA, Ma A. 2009. Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* 31(5):811-22.
- Mosmann TR and Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
- Mosolits S, Ullenhag G, Mellstedt H. 2005. Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results. *Ann Oncol* 16(6):847-62.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114(2):280-90.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194(5):629-44.
- Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172(2):834-42.
- Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. 2005. Selected toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6(8):769-76.
- Narayan R, Nguyen H, Bentow JJ, Moy L, Lee DK, Greger S, Haskell J, Vanchinathan V, Chang PL, Tsui S, *et al.* 2012. Immunomodulation by imiquimod in patients with high-risk primary melanoma. *J Invest Dermatol* 132(1):163-9.
- Narayanan P, Lapteva N, Seethammagari M, Levitt JM, Slawin KM, Spencer DM. 2011. A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. *J Clin Invest* 121(4):1524-34.
- Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. 1997. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 4(1):29-35.
- Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. 1997. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 150(2):641-51.

- Niitsu Y, Urushizaki Y, Koshida Y, Terui K, Mahara K, Kohgo Y, Urushizaki I. 1988. Expression of TGF-beta gene in adult T cell leukemia. *Blood* 71(1):263-6.
- Nyberg P, Salo T, Kalluri R. 2008. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci* 13:6537-53.
- Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC, Jr. 2009. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 9:3.
- Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411(6841):1058-64.
- Ochsenbein AF. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 9(12):1043-55.
- Oh S, Perera LP, Burke DS, Waldmann TA, Berzofsky JA. 2004. IL-15/IL-15Ralpha-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(42):15154-9.
- Ohteki T and MacDonald HR. 1994. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med* 180(2):699-704.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd. 2001. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(13):10229-33.
- Old LJ and Boyse EA. 1964. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med* 15:167-86.
- O'Neill LA and Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7(5):353-64.
- Othoro C, Johnston D, Lee R, Soverow J, Bystryn JC, Nardin E. 2009. Enhanced immunogenicity of plasmodium falciparum peptide vaccines using a topical adjuvant containing a potent synthetic toll-like receptor 7 agonist, imiquimod. *Infect Immun* 77(2):739-48.
- Oukka M. 2008. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3:iii26-9.
- Pardoll DM. 1993. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Opin Immunol* 5(5):719-25.
- Parker AK, Parker S, Yokoyama WM, Corbett JA, Buller RM. 2007. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *J Virol* 81(8):4070-9.
- Pasare C and Medzhitov R. 2004. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6(15):1382-7.
- Pierres M, Goridis C, Golstein P. 1982. Inhibition of murine T cell-mediated cytotoxicity and T cell proliferation by a rat monoclonal antibody immunoprecipitating two lymphoid cell surface polypeptides of 94 000 and 180 000 molecular weight. *Eur J Immunol* 12(1):60-9.
- Pollard JW. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4(1):71-8.
- Pritchard DM and Crabtree JE. 2006. Helicobacter pylori and gastric cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 22(6):620-5.

- Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, *et al.* 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332(6029):600-3.
- Rabinovich GA and Rubinstein N. 2001. Galectins: A novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. implications in immunopathological processes. *Medicina (B Aires)* 61(1):85-92.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25:267-96.
- Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, Zimmer J. 2007. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 81(1):144-53.
- Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, O'Donnell J, Patabhi S, Guderian JA, Mohamath R, Duthie MS, *et al.* 2010. Applying TLR synergy in immunotherapy: Implications in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 185(3):1701-10.
- Reed SG. 1999. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1(15):1313-25.
- Restifo NP and Rosenberg SA. 1999. Developing recombinant and synthetic vaccines for the treatment of melanoma. *Curr Opin Oncol* 11(1):50-7.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393(6684):474-8.
- Robert C and Ghiringhelli F. 2009. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 14(8):848-61.
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJW, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, *et al.* 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364(26):2517-26.
- Rock KL and Shen L. 2005. Cross-presentation: Underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-83.
- Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, *et al.* 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64(16):5839-49.
- Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, Fauci AS. 1986. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 136(10):3916-20.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9):909-15.
- Rowe M, Khanna R, Jacob CA, Argat V, Kelly A, Powis S, Belich M, Croom-Carter D, Lee S, Burrows SR. 1995. Restoration of endogenous antigen processing in burkitt's lymphoma cells by epstein-barr virus latent membrane protein-1: Coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol* 25(5):1374-84.

- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3):1151-64.
- Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-62.
- Salazar-Onfray F. 1999. Interleukin-10: A cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 16(2):86-94.
- Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE. 2005. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: Evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother* 28(3):220-8.
- San Roman B, De Andres X, Munoz PM, Obregon P, Asensio AC, Garrido V, Mansilla C, Arribillaga L, Lasarte JJ, De Andres D, *et al.* 2012. The extradomain A of fibronectin (EDA) combined with poly(I:C) enhances the immune response to HIV-1 p24 protein and the protection against recombinant listeria monocytogenes-gag infection in the mouse model. *Vaccine* .
- Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, Carlyle JR, Reis e Sousa C. 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118(6):2098-110.
- Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, Simons JW. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87(4):280-5.
- Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Pablos JL. 2005. Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 125(3):450-5.
- Saraiva M and O'Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10(3):170-81.
- Sargent ER, Gomella LG, Beldegrun A, Linehan WM, Kasid A. 1989. Epidermal growth factor receptor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma. *J Urol* 142(5):1364-8.
- Sato T, McCue P, Masuoka K, Salwen S, Lattime EC, Mastrangelo MJ, Berd D. 1996. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin Cancer Res* 2(8):1383-90.
- Schafer ZT and Brugge JS. 2007. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest* 117(12):3660-3.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684):480-3.
- Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, Tachado SD. 1999. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 283(5399):225-9.
- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM. 2002. Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12(1):25-31.

- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. 2011. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331(6024):1565-70.
- Schultz-Cherry S and Hinshaw VS. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol* 70(12):8624-9.
- Seliger B, Hohne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampe R, Huber C. 1996. Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2(8):1427-33.
- Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y. 2001. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 103(4):449-57.
- Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, Jackson H, Dimopoulos N, Tai T, Chen Q, Parente P, Jefford M, Masterman KA, *et al.* 2004. The impact of imiquimod, a toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun* 4:9.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832):1107-11.
- Shedlock DJ and Shen H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300(5617):337-9.
- Shevach EM. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 50(9):2721-4.
- Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sata S, Nagata-Takeshita H, Inoue M, Zhu T, Hasegawa M, Moroi Y, *et al.* 2006. Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant sendai virus and its modulation by exogenous IFN-beta gene. *J Immunol* 177(6):3564-76.
- Shortman K and Heath WR. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234(1):18-31.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284(5421):1835-7.
- Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. 1999. Cutting edge: Activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 163(5):2373-7.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192(5):755-60.
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. 2001. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13(4):459-63.
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334(6179):255-8.

- Stone GW, Barzee S, Snarsky V, Santucci C, Tran B, Langer R, Zugates GT, Anderson DG, Kornbluth RS. 2009. Nanoparticle-delivered multimeric soluble CD40L DNA combined with toll-like receptor agonists as a treatment for melanoma. *PLoS One* 4(10):e7334.
- Stout RD and Suttles J. 1996. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 17(10):487-92.
- Surh CD and Sprent J. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29(6):848-62.
- Svane IM, Engel AM, Nielsen MB, Ljunggren HG, Rygaard J, Werdelin O. 1996. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol* 26(8):1844-50.
- Szmunn W. 1978. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 24:40-69.
- Tacke PJ, Zeelenberg IS, Cruz LJ, van Hout-Kuijter MA, van de Glind G, Fokkink RG, Lambeck AJ, Figdor CG. 2011. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood* 118(26):6836-44.
- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T. 1991. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 146(3):1077-82.
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195(2):161-9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-76.
- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, *et al.* 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: Abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198(11):1741-52.
- Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, Schlemmer F, Zitvogel L, Kroemer G. 2008. Immunogenic cancer cell death: A key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 20(5):504-11.
- Thomann JS, Heurtault B, Weidner S, Braye M, Beyrath J, Fournel S, Schuber F, Frisch B. 2011. Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* 32(20):4574-83.
- Thomas DA and Massague J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8(5):369-80.
- Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Marsden R, Beck L, Corbeil J, Richman DD, Eiden JJ, Jr, Spiegelberg HL, Raz E. 2000. Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol* 30(7):1939-47.

- Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Bini M, Perez Alea M, Maria Florena A, Miceli L, Condorelli G, Bonventre S, Di Gesu G, *et al.* 2006. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer Res* 66(3):1491-9.
- Toes RE, Schoenberger SP, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. 1998. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* 10(6):443-8.
- Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. 2003. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. *Oncogene* 22(39):8021-30.
- Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. 1998. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4(3):585-93.
- Turza K, Dengel LT, Harris RC, Patterson JW, White K, Grosh WW, Slingluff CL, Jr. 2010. Effectiveness of imiquimod limited to dermal melanoma metastases, with simultaneous resistance of subcutaneous metastasis. *J Cutan Pathol* 37(1):94-8.
- Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS, Jr. 2008. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun* 8:16.
- van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, Altin JG. 2004. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: A highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res* 64(12):4357-65.
- Van Kooten C and Banchereau J. 1996. CD40-CD40 ligand: A multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 61:1-77.
- Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200(2):255-68.
- Vicari AP and Trinchieri G. 2004. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: Exiting the labyrinth? *Immunol Rev* 202:223-36.
- Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Roubardin-Combe C, Gerlier D, Manie S. 2000. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J* 19(13):3304-13.
- Villadangos JA and Schnorrer P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7(7):543-55.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? the example of natural killer cells. *Science* 331(6013):44-9.
- von Andrian UH and Mackay CR. 2000. T-cell function and migration. two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343(14):1020-34.
- von Boehmer H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6(4):338-44.
- Waldmann TA. 2003. Immunotherapy: Past, present and future. *Nat Med* 9(3):269-77.

- Wang J, Sun R, Wei H, Dong Z, Gao B, Tian Z. 2006. Poly I:C prevents T cell-mediated hepatitis via an NK-dependent mechanism. *J Hepatol* 44(3):446-54.
- Wang Y, Abel K, Lantz K, Krieg AM, McChesney MB, Miller CJ. 2005. The toll-like receptor 7 (TLR7) agonist, imiquimod, and the TLR9 agonist, CpG ODN, induce antiviral cytokines and chemokines but do not prevent vaginal transmission of simian immunodeficiency virus when applied intravaginally to rhesus macaques. *J Virol* 79(22):14355-70.
- Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S. 1993. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91(2):684-92.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821-52.
- Weber J. 2010. Immune checkpoint proteins: A new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37(5):430-9.
- Weinstein IB and Case K. 2008. The history of cancer research: Introducing an AACR centennial series. *Cancer Res* 68(17):6861-2.
- Wells JW, Cowled CJ, Farzaneh F, Noble A. 2008. Combined triggering of dendritic cell receptors results in synergistic activation and potent cytotoxic immunity. *J Immunol* 181(5):3422-31.
- Werling D and Jungi TW. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91(1):1-12.
- Witham TF, Villa L, Yang T, Pollack IF, Okada H, Robbins PD, Chambers WH. 2003. Expression of a soluble transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor reduces tumorigenicity by regulating natural killer (NK) cell activity against 9L gliosarcoma in vivo. *J Neurooncol* 64(1-2):63-9.
- Witz IP. 2006. Tumor-microenvironment interactions: The selectin-selectin ligand axis in tumor-endothelium cross talk. *Cancer Treat Res* 130:125-40.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61(12):4766-72.
- Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. 1993. Transforming growth factor beta and fibroblast growth factor as promoters of tumor progression to malignancy. *Crit Rev Oncog* 4(5):473-92.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64(19):7022-9.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4(11):1144-50.
- Yang L and Carbone DP. 2004. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* 92:13-27.

- Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, Greenberg PD. 1999. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol* 162(4):2227-34.
- Yokoi S, Niizeki H, Iida H, Asada H, Miyagawa S. 2009. Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J Dermatol Sci* 53(2):120-8.
- Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. 1995. Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 270(5243):1845-7.
- Zabaleta, A., Arribillaga, L., Llopiz, D., Dotor, J., Lasarte, J. J., Prieto, J., et al. (2007). Induction of potent and long-lasting CD4 and CD8 T-cell responses against hepatitis C virus by immunization with viral antigens plus poly(I:C) and anti-CD40. *Antiviral Research*, 74(1), 25-35.
- Zalatnai A. 2006. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 6(6):685-93.
- Zeh HJ, 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC. 1999. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* 162(2):989-94.
- Zhang L, Gajewski TF, Kline J. 2009. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood* 114(8):1545-52.
- Zhu Q, Egelston C, Vivekanandhan A, Uematsu S, Akira S, Klinman DM, Belyakov IM, Berzofsky JA. 2008. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: Implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(42):16260-5.
- Zhu Q, Egelston C, Gagnon S, Sui Y, Belyakov IM, Klinman DM, Berzofsky JA. 2010. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J Clin Invest* 120(2):607-16.
- Zinkernagel RM and Althage A. 1977. Antiviral protection by virus-immune cytotoxic T cells: Infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled. *J Exp Med* 145(3):644-51.
- Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. 2006. Dendritic cell-NK cell cross-talk: Regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:157-74.
- Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T. 1992. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* 149(4):1211-5.
- Zou W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6(4):295-307.

ANEXOS

ANEXO I: Artículos

Peptide inhibitors of transforming growth factor- β enhance the efficacy of antitumor immunotherapy

Diana Llopiz¹, Javier Dotor², Noelia Casares¹, Jaione Bezunartea¹, Nancy Díaz-Valdés¹, Marta Ruiz¹, Fernando Aranda¹, Pedro Berraondo¹, Jesús Prieto¹, Juan José Lasarte¹, Francisco Borrás-Cuesta¹ and Pablo Sarobe^{1*}

¹University of Navarra, Center for Applied Medical Research (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Pamplona, Spain

²Digna Biotech, Madrid, Spain

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a cytokine with potent immunosuppressive effects and is overexpressed in many tumors. Therefore, development of molecules able to inhibit TGF- β is of paramount importance to improve the efficacy of antitumor immunotherapy. TGF- β inhibitor peptides P144 and P17 were combined with the administration of adjuvant molecules poly(I:C) and agonistic anti-CD40 antibodies, and their effect on the growth of E.G7-OVA established tumors and on antitumor immune response was evaluated. Tumor rejection efficacy of a single administration of adjuvants was enhanced from 15 to 70 % when combined with repeated injections of TGF- β inhibitor peptides. Simultaneous administration of adjuvants and TGF- β inhibitor peptides was required for maximal therapeutic efficacy. Although tumor cells produced TGF- β , it was found that the beneficial effect of peptide administration was mainly due to the inhibition of TGF- β produced by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells rather than by tumor cells. The enhanced antitumor effect was accompanied by a higher activity of dendritic cells, natural killer cells and tumor antigen-specific T cells, as well as by a decrease in the number of myeloid-derived suppressor cells. In conclusion, administration of peptide inhibitors of TGF- β in therapeutic vaccination enhances the efficacy of immunotherapy by increasing antitumor immune responses. These peptide inhibitors may have important applications for current immunotherapeutic strategies.

© 2009 UICC

Key words: regulatory T cells; TGF- β ; inhibitor peptides; tumor immunotherapy

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a cytokine with pleiotropic effects, which is involved in many cellular processes.¹ Because of the antiproliferative properties of TGF- β , this cytokine has been traditionally considered as immunosuppressive and anti-inflammatory, although it may also act as a stimulator of several cell populations of the immune system.² This dual effect of TGF- β is well documented in the literature. Thus, it has been described that TGF- β inhibits differentiation and activity of T and B cells,^{3,4} prevents maturation of antigen-presenting cells (APC) such as dendritic cells⁵ and inhibits other cells of the innate immune system, such as natural killer (NK) cells.^{6,7} However, TGF- β is also necessary as an important differentiation factor for regulatory T (Treg) cells,⁸ in combination with interleukin (IL)-6 helps the differentiation of Th17 cells,⁹ promotes the production of IgA¹⁰ and it is essential for the development of Langerhans cells.¹¹ These properties of TGF- β are responsible for the homeostatic control of immune reactions under normal conditions. TGF- β is overexpressed in several pathologies, such as malignancies^{12–14} or infectious diseases.^{15–18} Indeed, it has been described that many tumors show high levels of this cytokine, which at early stages is able to inhibit tumor growth, but at later stages promotes tumor growth and metastasis.¹⁹ Together with these direct effects on tumors, TGF- β depresses immune responses,² leading to a situation where both effector cells and APC may have impaired functions. Furthermore, the number of Treg cells increases in the tumor as well as in the periphery. These effects may concomitantly preclude the induction of immune responses able to eliminate malignant cells.²⁰ Indeed, production of TGF- β is one of the escape mechanisms used by tumors to evade from immune surveillance. Thus, elevated TGF- β levels in malignant diseases are associated to a

poor prognostic.²¹ Several sources may be responsible for the high levels of TGF- β found in tumors. Malignant cells, tumor stroma cells and infiltrating cells have been reported to produce TGF- β .²² Thus, TGF- β may help the differentiation and maintenance of FoxP3⁺ Treg cells,^{23,24} which in turn inhibit the induction of immune responses through several mechanisms, including the subsequent production of more TGF- β .

In the last years, several strategies have been used to induce efficient antitumor immune responses. These strategies are based, in many cases, on the use of tumor antigens that can be recognized by T cells together with adjuvants able to activate innate immune cells responsible for antigen presentation.²⁵ However, as suggested by several authors, successful induction of immune responses might benefit not only from the use of those strategies triggering effector cells but also from new strategies aimed at inhibiting immunosuppressive mechanisms used by tumors to evade immune response.²⁶ Because of the immunosuppressive role of TGF- β , inhibition of this cytokine, in combination with vaccination strategies, leading at inducing antitumor T-cell activation, may enhance the efficacy of immunotherapy. Several strategies using neutralizing antibodies, TGF- β -binding soluble proteins, antisense compounds or small molecule inhibitors targeting TGF- β signaling, have shown that TGF- β inhibition helps in antitumor therapy.^{22,27} Some of these compounds have shown their value by directly inhibiting tumor growth and metastasis, whereas others have been able to enhance antitumor immune responses. We have developed 2 peptide inhibitors of TGF- β 1, namely peptides P144 and P17. Peptide P144 inhibitory activity has been characterized *in vitro* and *in vivo* in different models of liver fibrosis and scleroderma^{28,29} and has entered a phase II clinical trial for the treatment of scleroderma. Peptide P17 inhibits TGF- β activity *in vitro* and *in vivo*,³⁰ in liver fibrosis models, and we recently characterized its properties as an immunomodulator.³¹ Thus, we were interested in analyzing whether these TGF- β inhibitor peptides could be of therapeutic value to potentiate the efficacy of antitumor immunotherapy. In a previous work, we have shown that a single intratumor administration of adjuvant molecules polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) and anti-CD40 is able to reject only 15% of established E.G7-OVA tumors.³² Thus, in the present work, we decided to combine this immunotherapeutic strategy with the

Abbreviations: APC, antigen-presenting cells; DC, dendritic cells; NR, mice which did not reject the tumor; poly(I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; R, mice which rejected the tumor; TGF- β , transforming growth factor- β ; Treg, regulatory T cells.

Grant sponsors: Fundación Mutua Madrileña, Gobierno de Navarra and Ministerio de Educación y Ciencia; Grant number: SAF2007-61432 (to J.J.L.); Grant sponsor: UTE project CIMA.

Borrás-Cuesta is a consultant of Digna Biotech, which holds patents on TGF- β peptide inhibitors.

*Correspondence to: University of Navarra, Center for Applied Medical Research (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Pío XII 55, 31008 Pamplona, Spain. Fax: 34 948 194717. E-mail: psarobe@unav.es
Received 18 December 2008; Accepted after revision 5 June 2009

DOI 10.1002/ijc.24656

Published online 15 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

administration of P144 and P17 to inhibit systemic and tumor TGF- β . The results of this combined tumor therapy and the mechanisms associated with their effects are shown below.

Material and methods

Reagents

Peptide inhibitors of TGF- β P17 and P144 and peptide OVA(257-264)³³ were synthesized by NeoMPS (Strasbourg, France) and had a purity above 95% as determined by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. OVA protein was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Poly(I:C) was obtained from Amersham (Barcelona, Spain). Imiquimod was used as AldaraTM cream (Meda Pharma; Madrid, Spain) and agonistic anti-CD40 antibody was obtained from ascitic fluid of nude mice injected with the FGK45.5 hybridoma cells³⁴ and purified by ammonium sulfate precipitation.

Mice

Six- to 8-week-old female C57BL/6 mice were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). Rag1^{-/-} mice in C57BL/6 background were kindly provided by Dr. I. Melero (Center for Applied Medical Research, Pamplona, Spain). All animals were maintained in pathogen-free conditions and treated according to the guidelines of our institution, after study approval by the review committee.

Cell lines

Parental EL-4 thymoma cells (H-2^b), OVA-transfected E.G7-OVA cells³⁵ and the NK-sensitive cell line YAC-1 were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and were grown as described.³² B16.OVA melanoma cells³⁶ were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum and antibiotics.

In vitro tumor cell proliferation

E.G7-OVA cells were cultured (6×10^4 /ml) in 24-well plates (2 ml/well) with or without TGF- β peptide inhibitors (100 μ g/ml). One day later, 0.3 μ l of fluorochrome-conjugated beads (CalibriteTM3; BD-Biosciences) were added to the wells, their content was harvested and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the amount of cells corresponding to 500 collected fluorescent beads.

Tumor treatment experiments

C57BL/6 or Rag1^{-/-} mice were injected subcutaneously with 5×10^5 E.G7-OVA cells and when the tumor diameter reached 5–6 mm, they received a single intratumor (i.t.) administration of poly(I:C) (50 μ g/mouse) and anti-CD40 (50 μ g/mouse) with or without peptide inhibitors of TGF- β administered i.t. (P144; 50 μ g/mouse) and i.p. (P17; 50 μ g/mouse) every 2 days during 3 weeks. Alternatively, C57BL/6 mice were injected intradermally with 10^5 B16.OVA cells, and when the tumor diameter reached 4–5 mm, they received 5 topical applications of Imiquimod cream (2.5 mg/mouse), with or without inhibitors of TGF- β administered as above. Untreated mice challenged with tumor cells were used as positive controls of tumor growth. Tumor volume was calculated according to the formula: $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Mice were killed when tumor diameter reached 17 mm.

Adoptive transfer experiments

Rag1^{-/-} mice were injected with tumor cells as described above, and 1 week later (when the tumor diameter reached approximately 5 mm) they were injected i.v. with 10^7 total spleen cells or CD25⁻ splenocytes obtained from C57BL/6 mice, selected from the negative fraction of spleen cells purified with the murine Treg cell isolation kit (Miltenyi Biotec; Auburn, CA). One day after adoptive transfer, mice received different treatment protocols.

ELISPOT

T cells producing interferon (IFN)- γ were enumerated by ELISPOT assays using a kit from BD-Biosciences (San Diego, CA), according to manufacturer instructions. Briefly, plates (Multi-screen HTS; Millipore, Bedford, MA) were coated overnight with anti-IFN- γ antibody, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and blocked for 2 h with RPMI containing 10% fetal calf serum. Then, 4×10^5 splenocytes were cultured in triplicate in the absence or in the presence of peptide OVA(257-264) (1 μ g/ml), OVA protein (10 μ g/ml) or 4×10^4 E.G7-OVA cells, EL-4 cells or splenocytes, previously treated with mitomycin C. When measuring NK cell-derived production of IFN- γ , splenocytes were incubated with 4×10^4 mitomycin C-treated YAC-1 cells. In all cases, 1 day later, plates were washed with PBS and incubated with biotinylated anti-IFN- γ antibody. After 2 h, plates were washed and incubated with a 1/100 dilution of streptavidin peroxidase. One hour later, plates were washed and developed with freshly prepared 3-amino-9-ethylcarbazole solution. The reaction was stopped with distilled water and spots were counted using an automated ELISPOT reader (CTL; Aalen, Germany).

In vivo killing assay

Spleen cells from naïve mice were pulsed for 30 min with OVA(257-264) (10 μ g/ml). After extensive washes, cells were labeled with 5 μ mol/L carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE^{high}; Molecular Probes). Control nonpeptide-treated splenocytes were labeled with 0.5 μ mol/L CFSE (CFSE^{low}). CFSE^{high} and CFSE^{low} cells were mixed at a 1:1 ratio, and 10^7 cells were injected i.v. into naïve mice (control) or mice belonging to experimental groups. Sixteen hours later, spleens were removed and single-cell suspensions were analyzed by flow cytometry to measure the ratio of CFSE^{high} to CFSE^{low} cells. The percentage of specific lysis was calculated as follows: percent-specific lysis = $100 - [100 \times (\% \text{ CFSE}^{\text{high}} \text{ experimental} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}} \text{ experimental}) / (\% \text{ CFSE}^{\text{high}} \text{ control} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}} \text{ control})]$.

Flow cytometry

OVA(257-264)-specific cells, Treg cells, NK cells and DC were analyzed in tumor-draining lymph nodes and in the spleen. After treatment with collagenase and DNase for 15 min, lymphoid organs were homogenized. Cells were first incubated for 10 min with Fc BlockTM (BD-Biosciences) and then stained with specific antibodies. OVA(257-264)-specific cells were enumerated using PE-labeled OVA(257-264)/H-2K^b tetramers (Immunomics; Marseille, France), anti-CD8-FITC antibodies (BD-Biosciences) and anti-CD3-APC (BD-Biosciences). Treg cells were analyzed using a kit (eBioscience; San Diego, CA) containing anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC and anti-FoxP3-PE-labeled antibodies, according to the manufacturer's instructions. For NK cell analysis, cells were stained with anti-CD69-FITC, anti-CD3-PE and anti-NK1.1-APC-labeled antibodies (all from BD-Biosciences). DC were analyzed using anti-CD11c-APC, anti-CD86-FITC, anti-CD80-FITC, antiCD40-FITC and anti-IA^b-PE-labeled antibodies (all from BD-Biosciences). Expression of the latency associated peptide (LAP) of TGF- β was analyzed by staining tumor cells and tumor-infiltrating cells with anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC and anti-LAP-PE (R&D Systems; Minneapolis, MN) labeled antibodies. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) were analyzed using anti-Ly6C-FITC, anti-IL-4R-PE and anti-CD11b-APC-labeled antibodies (all from BD-Biosciences). After staining, cells were washed, and the expression of the different markers was studied by using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and Flowjo software (Tree Star; Ashland, OR).

Measurement of cytokines from serum and culture supernatants

Serum was obtained from the retroorbital plexus of mice, and IL-12 and TNF- α content was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; BD-Biosciences), according to manufacturer instructions. Free and total TGF- β present in E.G7-OVA

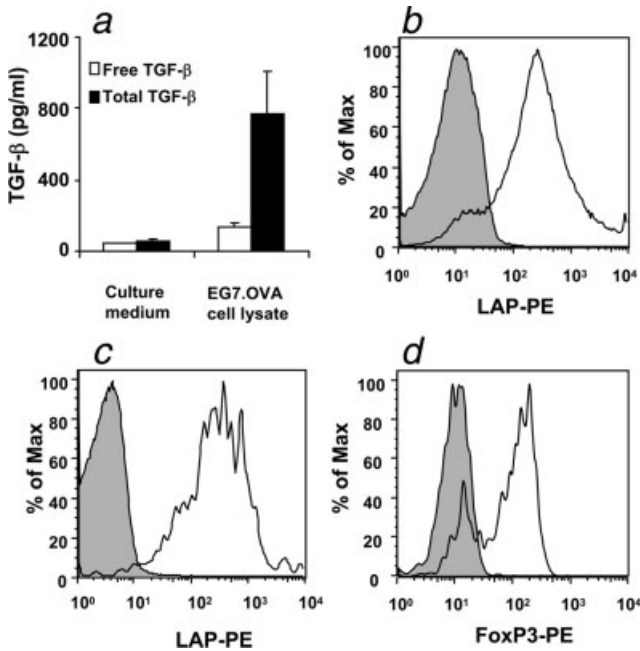


FIGURE 1 – Production of TGF- β in E.G7-OVA tumors. (a) E.G7-OVA cells (4×10^7) were centrifuged, lysed, and their supernatant resuspended in 1 ml. TGF- β (free and total) was measured by ELISA. As a control, RPMI culture medium containing 10% FCS was used. Values represent mean \pm SEM ($n = 2$). (b) E.G7-OVA tumors (5 mm diameter) obtained from C57BL/6 mice were homogenized and cells were analyzed by flow cytometry. Tumor cells were gated based on forward and side scatter, and membrane TGF- β expression was analyzed by staining with isotype control antibodies (grey area) or antibodies against LAP (open area). (c, d) Lymphocytes from the same tumor homogenates were gated based on forward and side scatter and stained with antibodies against CD4, CD25, LAP and FoxP3. Expression of LAP (c) and FoxP3 (d) was analyzed in the CD4⁺CD25⁺ cell population. Grey area corresponds to isotype control antibodies. Results are representative of 3 different mice.

culture supernatant and in cell homogenates was quantified by ELISA (BD-Biosciences).

Statistical analysis

Survival curves of animals treated with different protocols were plotted according to the Kaplan–Meier method and were compared using the log-rank test. Data corresponding to immune response parameters are presented as mean \pm SEM. They were analyzed using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple comparison test (GraphPad Software). For all analyses, $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

TGF- β is produced in E.G7-OVA tumors

As previously mentioned, TGF- β is produced in some tumors to evade immunosurveillance. Before studying the effect of TGF- β inhibitor peptides on the efficacy of immunotherapy, we studied if TGF- β was produced in E.G7-OVA tumors. Although the levels of secreted TGF- β in tumor culture supernatants were below the detection limit of the ELISA (100 pg/ml; data not shown), cell lysates from E.G7-OVA cells contained detectable levels of TGF- β , in the range of 130–750 pg/ml for free and total TGF- β , respectively (Fig. 1a). Moreover, most tumor cells obtained from implanted tumors had membrane-bound TGF- β LAP, a component of an inactive complex of TGF- β ,³⁷ as detected by flow cytometry (Fig. 1b). Regarding tumor-infiltrating cells, analysis of CD4⁺CD25⁺ cells showed that most of them expressed this form

of TGF- β in their membrane (Fig. 1c). These CD4⁺CD25⁺ cells belonged to the Treg cell population, because they were also FoxP3⁺ (Fig. 1d). Thus, in E.G7-OVA tumors, TGF- β is expressed not only by tumor cells but also by most infiltrating CD4⁺CD25⁺ Treg cells.

Administration of TGF- β inhibitors together with adjuvants enhances the efficacy of immunotherapy

In a previous work, we demonstrated that in the absence of exogenous antigen, a single i.t. administration of adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 induced rejection of E.G7-OVA established tumors in around 15% of mice.³² Because, as demonstrated in Figure 1, TGF- β is expressed in this tumor model, we decided to combine a single i.t. administration of adjuvants and repeated administration of TGF- β inhibitor peptides. Thus, mice were injected with E.G7-OVA tumor cells, and when tumors reached a size of 5–6 mm, animals were (i) left untreated, (ii) given a single administration of adjuvants at day 0, (iii) peptides P144 (i.t.) and P17 (i.p.) every 2 days during 20 days, or (iv) a single administration of adjuvants at day 0 plus peptides during 20 days. Simultaneous administration of peptides by i.t. and i.p. routes was carried out with the purpose of inhibiting both local and systemic TGF- β . As shown in a representative experiment in Figure 2a, the combination of TGF- β inhibitor peptides with a single administration of adjuvants enhanced tumor rejection from 16 to 50% respect to treatment with adjuvants only. Repeated experiments showed that combination of adjuvants and inhibitor peptides rejected tumors in 70% of mice ($n = 17$), compared with mice receiving only adjuvants (15%, $n = 20$) ($p < 0.01$). The beneficial effect of peptide inhibitors was probably due to their action on immune cells and not to direct effects on tumor cells, because administration of inhibitor peptides to tumor-bearing mice without any additional immunotherapy did not induce tumor rejection. Moreover, *in vitro* experiments performed with tumor cells cultured in the presence of peptides showed that peptides did not have any effect on tumor cell proliferation (Fig. 2b).

In a prophylactic vaccination model, we have found that inhibition of TGF- β simultaneously or immediately after antigen administration has a detrimental effect (J.J. Lasarte, unpublished observations). However, administration of TGF- β inhibitors 1 week after immunization enhanced the induction of immune responses.³¹ Thus, we decided to study the most appropriate time of administration of TGF- β inhibitor peptides in our model. With this aim, tumor-bearing mice were treated with adjuvants, and TGF- β inhibitors were administered at different time points. As shown in Figure 2c, when administration of TGF- β inhibitors was started at the same time as administration of adjuvants, all mice rejected their established tumors. By contrast, if administration of inhibitors was started 6 days after administration of adjuvants, only 1 mouse of 7 was able to reject its tumor ($p < 0.01$, adjuvant + inhibitors at day 0 vs. adjuvants + inhibitors at day 6). This last result was identical to that obtained after the administration of adjuvants only. Thus, simultaneous administration of adjuvants and inhibition of TGF- β enhances the efficacy of adjuvant immunotherapy.

Therapeutic effect of peptide inhibitors takes place by blocking TGF- β produced by CD4⁺CD25⁺ Treg cells

As shown in Figure 1, TGF- β found in tumors can be produced by tumor cells or by infiltrating cells, such as CD4⁺CD25⁺ Treg cells. To characterize whether the therapeutic efficacy of peptides takes place by inhibiting TGF- β produced by this cell population, treatment with adjuvants and TGF- β inhibitor peptides was performed in mice lacking these cells. Thus, tumor-bearing Rag1^{-/-} mice were adoptively transferred with CD25⁻ spleen cells from C57BL/6 mice, and 1 day later, they were left untreated, treated with adjuvant immunotherapy or with adjuvants plus TGF- β inhibitors. A delay in tumor growth was observed in transferred animals receiving adjuvants with or without TGF- β inhibitors

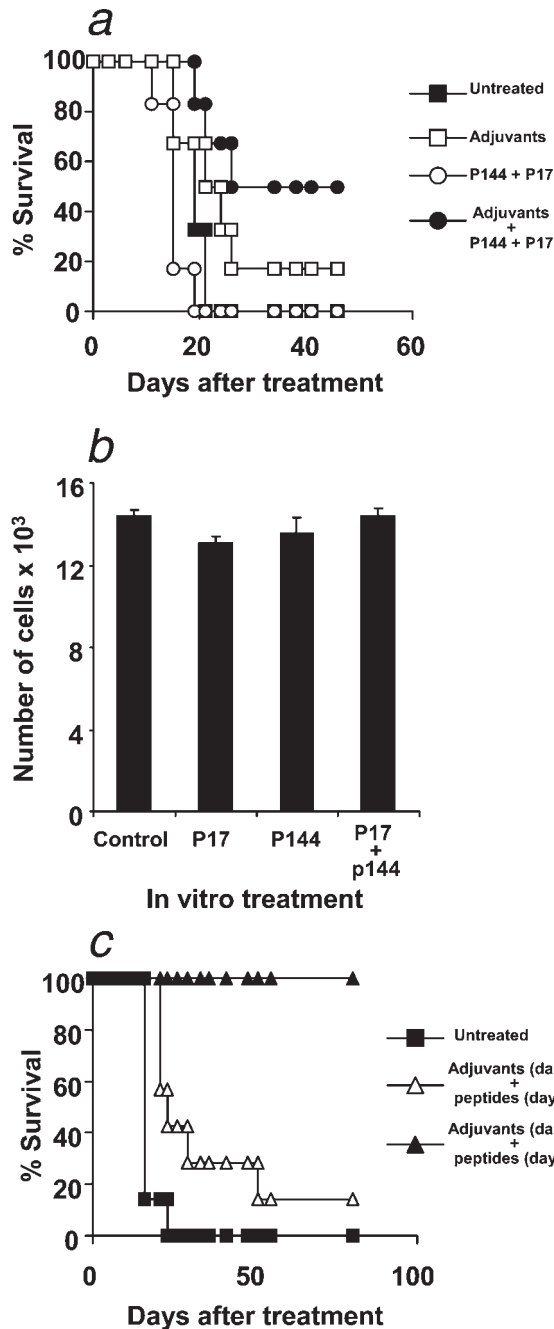


FIGURE 2 – TGF- β inhibitor peptides enhance the efficacy of adjuvant-based immunotherapy. (a) C57BL/6 mice ($n = 6$) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they were left untreated, received a single i.t. administration of adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40, 10 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) in a 20-day interval or a combination of adjuvants plus 10 administrations of peptides. Figure shows survival of mice and is representative of 3 different experiments. (b) E.G7-OVA tumor cells were cultured with or without peptide inhibitors (100 μ g/ml) and 1 day later, fluorochrome-conjugated beads were added to the wells, their content was harvested and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the amount of cells corresponding to 500 collected fluorescent beads, (c) C57BL/6 mice (6–7 per group) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they received a single i.t. administration of adjuvants plus 10 administrations of TGF- β inhibitors, starting at day 0 or 6 after adjuvant treatment, or left untreated. Figure shows survival of mice. (** $p < 0.01$, adjuvant + inhibitors at day 0 vs. adjuvants + inhibitors at day 6).

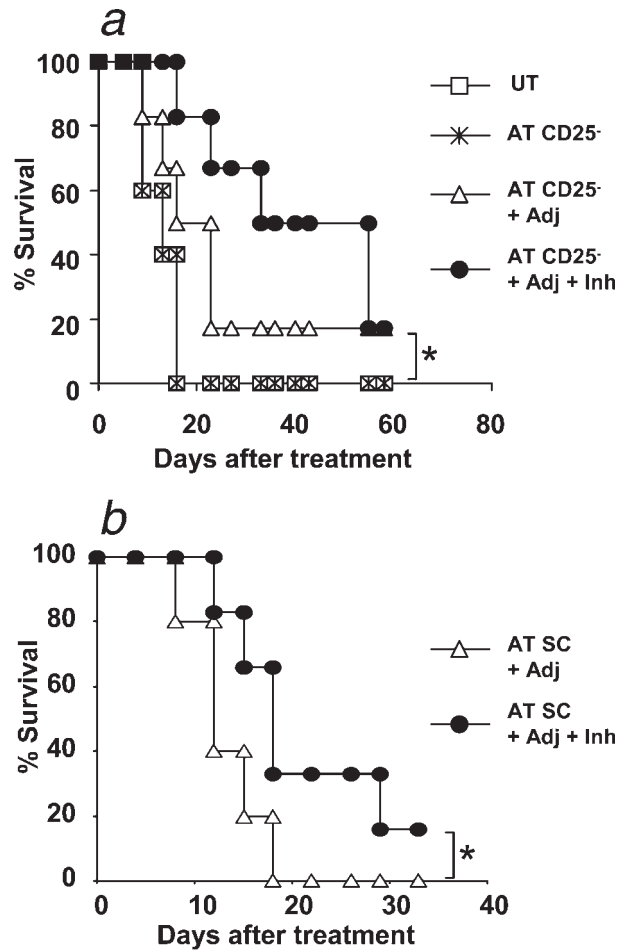


FIGURE 3 – Therapeutic effect of TGF- β inhibitors takes place only in the presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. (a) Rag1^{-/-} mice (5–6 per group) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and 1 week later, when the tumor diameter reached approximately 5 mm, they were injected i.v. with 10^7 CD25⁻ spleen cells obtained from C57BL/6 mice. One day after adoptive transfer, mice were left untreated (AT CD25⁻), received a single i.t. administration of adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 (AT CD25⁻ + Adj), or a combination of adjuvants plus 10 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) in a 20-day interval (AT CD25⁻ + Adj + Inh). A control group without any cell transfer or treatment was also included (UT). (* $p < 0.05$, AT CD25⁻ + Adj vs. AT CD25⁻ + Adj + Inh vs. AT CD25⁻ or UT). (b) Rag1^{-/-} mice (5–6 per group) were injected with tumor cells as in (a), and 1 week later adoptively transferred with 10^7 total spleen cells obtained from C57BL/6 mice. One day later, they were treated with adjuvants (AT SC + Adj) or with adjuvants plus peptides P17 and P144 (AT SC + Adj + Inh). (* $p = 0.05$, AT SC + Adj vs. AT SC + Adj + Inh). Figures represent survival of mice.

compared with transferred animals not receiving adjuvants or untreated animals (data not shown), which was associated with a more prolonged survival (Fig. 3a) ($p < 0.05$; adoptive transfer + adjuvants or adoptive transfer + adjuvants + TGF- β inhibitors vs. adoptive transfer or untreated). However, no statistical differences ($p = 0.29$) were observed in the kinetics of survival curves in transferred animals receiving adjuvants plus TGF- β inhibitors respect to animals transferred and treated only with adjuvants. Control experiments performed in Rag1^{-/-} mice adoptively transferred with total spleen cells and treated with adjuvants showed that in this case, peptide administration prolonged animal survival ($p = 0.05$), although not as clearly as in the case of C57BL/6 mice, probably due to the low number of effector cells present in

transferred Rag1^{-/-} mice (Fig. 3b). Thus, in the absence of CD25⁺ Treg cells, administration of TGF- β inhibitors does not improve the efficacy of treatment, suggesting that the therapeutic effect of these inhibitors takes place mainly by inhibiting TGF- β produced by this cell population.

Inhibition of TGF- β , when combined with adjuvant immunotherapy, enhances adaptive and innate immunity in tumor-bearing animals

As mentioned in the Introduction section, TGF- β inhibits different cell populations responsible for antitumor immune responses. To characterize the immunological effect of inhibiting TGF- β during adjuvant immunotherapy, animals were treated with different protocols (untreated mice, adjuvants or adjuvants plus TGF- β inhibitors). Several days after starting the treatment, some cell subsets were analyzed in lymphoid organs. The number of Treg cells was evaluated at day 14 by flow cytometry, by measuring the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ cells in the CD4⁺ subset in the tumor-draining lymph node. No differences were found in the proportion of Treg cells between the different groups of animals (Fig. 4a). Equivalent results were obtained when splenic Treg cells were analyzed (data not shown).

The result on effector T cells following inhibition of TGF- β was first analyzed by measuring the number of antigen-specific CD8⁺ cells in the tumor-draining lymph node. This was done using OVA(257-264)/H-2K^b tetramers, because OVA is an antigen expressed by E.G7-OVA tumor cells. These experiments showed that at day 14, animals treated with adjuvants plus TGF- β inhibitors had higher levels of these cells, although these values did not reach statistically significant differences (Fig. 4b). Equivalent results were obtained when we studied these cells in the spleen (data not shown). Lytic activity against OVA(257-264)-presenting cells induced in these animals was measured by *in vivo* killing assays. No activity was detected in untreated mice, only 1 mouse had measurable values in the group treated with adjuvants and all but 1 mouse displayed lytic activity in the group treated with adjuvants and peptide inhibitors (Fig. 4c). We also studied the functional properties of T cells by measuring IFN- γ production against OVA-derived antigens. Because not all mice treated with adjuvants plus TGF- β inhibitors rejected their tumor, animals belonging to this group were analyzed separately, distinguishing between those which rejected (R) and those that did not reject (NR) their tumor. It was found that untreated animals had no measurable responses against OVA protein or OVA(257-264) peptide (data not shown). Mice treated with a single adjuvant administration had weak responses against OVA or OVA(257-264) peptide, similar to NR mice. However, mice belonging to the R group had enhanced responses against OVA ($p < 0.05$, R vs. NR; $p < 0.01$, R vs. adjuvants) or against OVA(257-264) peptide ($p < 0.01$, R vs. NR; $p < 0.01$, R vs. adjuvants) (Fig. 4d). Regarding responses against tumor cells, weak responses were detected in untreated mice (not shown), in adjuvant-treated mice, and in mice belonging to the NR group. By contrast, strong responses against E.G7-OVA cells were found in mice from the R group ($p < 0.01$, R vs. NR; $p < 0.01$, R vs. adjuvants) (Fig. 4e). Moreover, responses against parental EL-4 cells were higher in the R group, compared with mice treated only with adjuvants ($p < 0.01$), suggesting that besides OVA responses against other antigens were induced. Thus, rejection of tumors in animals receiving adjuvants and TGF- β inhibitors is associated with higher antitumor T cell responses.

Because cells belonging to the innate immune system (DC, macrophages, NK cells) express receptors recognizing adjuvant molecules, and we had previously demonstrated that tumor rejection was partially dependent on NK cells,³² activation of innate immune cells was first studied by measuring serum cytokines at day 7 after starting treatment. It was found that in the absence of adjuvant administration, tumor-bearing animals had almost undetectable levels of IL-12 and TNF- α . However, adjuvant adminis-

tration clearly induced these cytokines, which were higher in animals receiving also TGF- β inhibitors, although this difference did not reach statistical significance (Fig. 5a). Regarding DC, expression of CD80, CD40, CD86 and major histocompatibility complex class II (I-A^b) in CD11c⁺ cells from tumor-draining lymph nodes was higher in mice treated with adjuvants plus TGF- β inhibitors than in mice receiving only adjuvants (Fig. 5b), reaching statistical significance ($p < 0.05$) in all markers except CD80. Activated NK cells were first counted by flow cytometry as CD3⁻NK1.1⁺CD69⁺ in the draining lymph node, giving similar values for all groups (Fig. 5c). Experiments performed using splenocytes showed equivalent results (data not shown). When lytic activity of NK cells against the NK cell-sensitive cell line YAC-1 was measured, administration of peptide inhibitors plus adjuvants did not induce higher levels than those induced by adjuvants alone (data not shown). However, when NK cell activity was measured as IFN- γ production against YAC-1 cells, combination of adjuvants plus TGF- β inhibitors significantly enhanced the number of IFN- γ -producing NK cells ($p < 0.01$, adjuvant + TGF- β inhibitors vs. adjuvants; $p < 0.01$, adjuvant + TGF- β inhibitors vs. untreated) (Fig. 5d). Statistical analysis of these immune parameters did not show any correlation with tumor size (data not shown), probably due to the early time point to observe an effect on tumor growth. These results demonstrate that administration of TGF- β inhibitor peptides enhances the activity of cells belonging to the innate immune system.

Finally, we analyzed MDSC, an important immunosuppressive mechanism associated to tumors.³⁸ This was done because mice bearing EL-4 tumors, the parental cell line from which E.G7-OVA derives, have elevated levels of MDSC.³⁹ Analysis of spleens in mice with 7-day tumors showed that adjuvant administration enhanced the proportion of MDSC compared with untreated animals ($p < 0.01$). However, administration of TGF- β inhibitor peptides together with adjuvants decreased the proportion of these cells ($p < 0.05$; adjuvants vs. adjuvant + TGF- β inhibitors), reaching levels similar to those found in untreated mice (Fig. 6).

Efficacy of the different TGF- β peptide inhibitors on adjuvant immunotherapy

Finally, because in previous experiments 2 TGF- β inhibitor peptides were administered simultaneously, we studied if administration of both inhibitors was indeed required to achieve the therapeutic effect. Thus, in a first set of experiments, all mice except controls received the adjuvants. A group also received a combination of 50 μ g of P144 i.t. and 50 μ g of P17 i.p., whereas 2 other groups received either 50 μ g of P144 i.t. or 50 μ g of P17 i.p.. It was found that the combination of 50 μ g of P144 i.t. and 50 μ g of P17 i.p in conjunction with a single administration of adjuvants induced tumor rejection in 70% of mice. By contrast, only 17 and 25% of mice cleared their tumors when treated with adjuvants in combination with 50 μ g of P144 i.t. or with 50 μ g of P17 i.p., respectively (data not shown). To understand whether the beneficial effect of simultaneous administration of both peptides was either due to the additive effect of both peptides via their respective routes or to an enhancement of the amount of inhibitor available, in a second set of experiments, we treated mice with a single dose of adjuvants, and either 100 μ g of P144 i.t. or 100 μ g of P17 i.p. during 20 days. As shown in Figures 7a and 7b, administration of 100 μ g of P17 i.p. or 100 μ g of P144 i.t. was able to reject tumors in 5 of 12 treated mice (41%) and 4 of 12 mice (33%), respectively, lower but not statistically different efficacies than 6 of 12 mice treated with 50 μ g of P17 i.p. and 50 μ g of P144 i.t. (50% survival). To confirm the effect of peptide inhibitors on a second tumor model, mice with established B16.OVA tumors were treated with 5 topical applications of the TLR7 ligand Imiquimod during a 20-day period, with or without i.p. administration of 100 μ g of P17. In this case, no beneficial effect was observed due to peptide administration (Fig. 7c). However, when mice were treated with Imiquimod plus the classical protocol using P144 i.t.

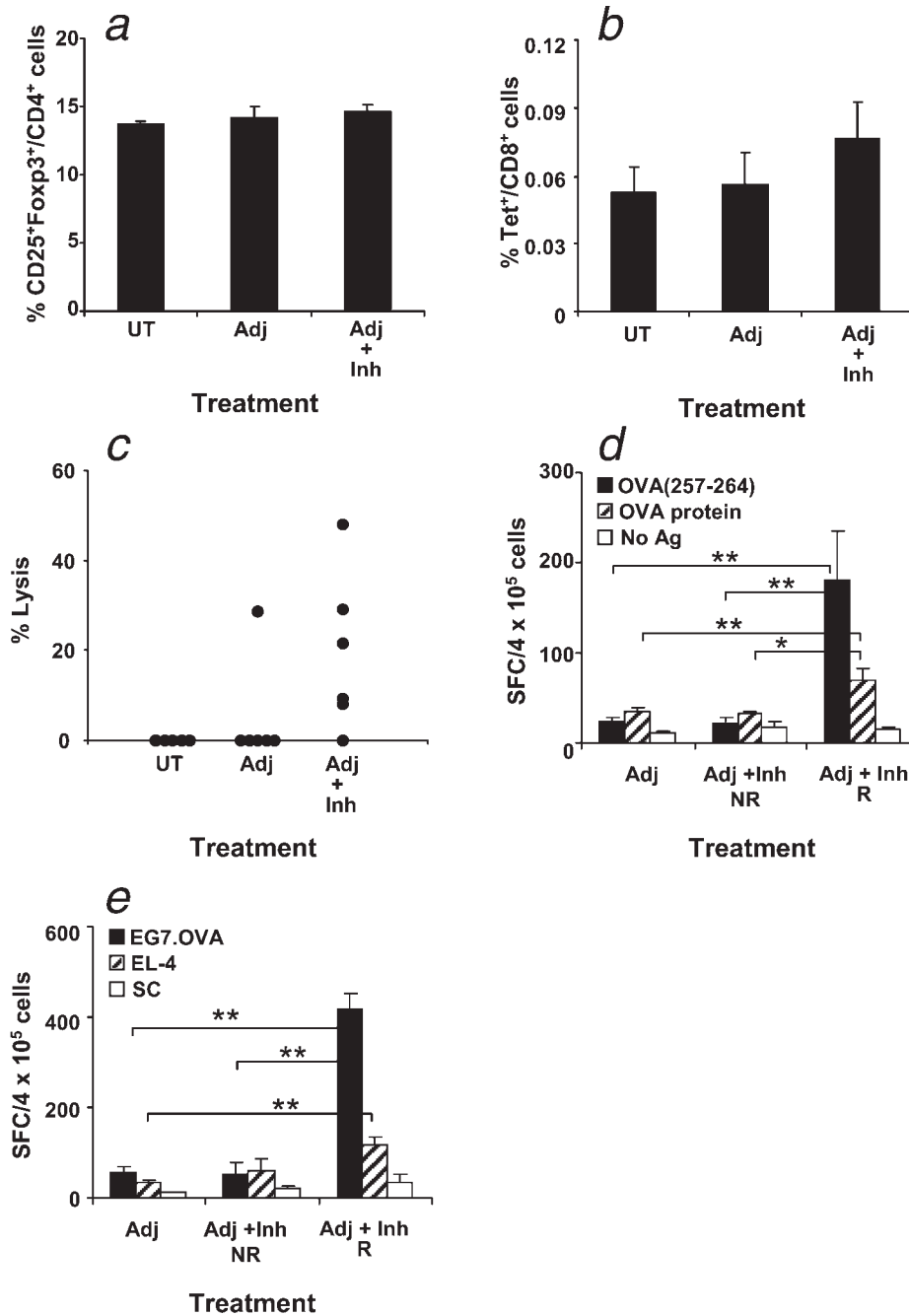


FIGURE 4 – Effect of TGF- β inhibitor peptides on antitumor adaptive immune responses. C57BL/6 mice (4–7 per group) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they were left untreated (UT), received a single i.t. administration of poly(I:C) and anti-CD40 (Adj), or adjuvants plus 7 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) in a 14-day interval (Adj + Inh). Tumor-draining lymph nodes were homogenized and cell suspensions were stained with anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC and anti-FoxP3-PE-labeled antibodies to measure the number of regulatory T cells (a) or with PE-labeled OVA(257-264)/H-2K^b tetramers, anti-CD3-APC and anti-CD8-FITC antibodies to measure OVA(257-264)-specific cells (b). Lytic activity against OVA(257-264)-presenting spleen cells was analyzed and *in vivo* killing assay after injection of splenocytes pulsed with peptide OVA(257-264) and labeled with CFSE to mice belonging to the different groups (c). Percentage of lysis was calculated as described in Methods section. Immune responses against OVA(257-264) peptide, OVA protein (d) or against E.G7-OVA or EL4 tumor cells (e) of splenocytes from animals treated as above were analyzed using an IFN- γ ELISPOT, but considering different groups between those nonrejecting (NR) or rejecting (R) tumors (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). Values correspond to mean \pm SEM, and they are representative of 2 different experiments.

and P17 i.p., although all animals finally died, tumor growth was inhibited during the treatment period ($p < 0.05$) (Fig. 7d), suggesting that different tumor models may require different regimens of TGF- β inhibition.

Discussion

Because the outcome of the balance between mechanisms inducing or suppressing antitumor immune responses is either tumor rejection or tumor growth, it has been proposed that the

blockade of immunosuppressive factors might enhance the efficacy of immunotherapy. Among these factors, TGF- β is an attractive target because its suppressive effects are exerted at different levels and on several populations of the immune system.² We have previously characterized 2 peptide inhibitors of TGF- β , which are able to bind to different isoforms of this cytokine (Ref. 31 and our unpublished results), and as a consequence, in-

hibit the biological actions that it promotes on different cells.^{28–31} Here, we show that when adjuvant immunotherapy is combined with administration of these peptide inhibitors of TGF- β , a clear synergistic enhancement of therapeutic efficacy is found. This beneficial effect is only detected when inhibitor peptides are administered in combination with immunotherapy, because administration of peptides alone does not lead to tumor rejection. Moreover, administration of adjuvants and inhibitor peptides needs to be started the same day. Indeed, if inhibition of TGF- β is delayed 1 week, the effect is lost. These results suggest that tumor cells are not able to trigger effective antitumor responses even in the absence of TGF- β , but inhibition of this cytokine during immunotherapy leads to efficient antitumor immunity.

Several sources of TGF- β can be found in tumors, and as shown in Figure 1, not only tumor cells but also Treg cells are responsible for TGF- β production. Experiments performed in mice lacking CD25⁺ cells showed that TGF- β inhibition did not have a clear beneficial effect on these animals. Indeed, only a weak delay in tumor growth (although not statistically significant) was observed, compared with animals receiving adjuvants only. Thus, although it cannot be ruled out that this delay may be due to the inhibition of TGF- β produced by other immune cells or by tumor cells, our results suggest that the beneficial effect obtained after peptide administration is mainly due to the blockade of TGF- β produced by Treg cells. Production of TGF- β by tumor cells might affect intratumor antigen capture and DC activation, and later the effector functions of activated antitumor lymphocytes. However, because Treg cells may be found both in tumors and in lymphoid organs, production of TGF- β by these cells might be responsible for the effect on DC and lymphocyte effector functions described earlier, as well as on the lymphocyte induction phase, which takes place in lymphoid organs. This may explain why inhibition of TGF- β produced by Treg cells may have a higher impact on therapeutic efficacy than inhibition of TGF- β produced by tumor cells. Although it has been described that TGF- β is important for Treg expansion,^{24,40} we have not seen a decrease in the number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in the different lymphoid organs studied (tumor-draining lymph nodes and spleen), suggesting that in our model, TGF- β inhibition acts by blocking the effect that the cytokine has on immune cells responsible for antitumor activity, but not by decreasing the number of Treg cells.

Regarding the effect on innate immunity, an enhancement on IL-12 and TNF- α production was found after TGF- β inhibition, although this result did not reach statistical significance probably due to variability between animals. Moreover, systemic levels of these cytokines might not correctly reflect production inside the tumor or the lymphoid organs. Furthermore, analysis of lymph node DC showed that animals treated with adjuvant plus TGF- β inhibitors displayed higher levels of maturation markers compared with untreated animals or animals treated with adjuvants. Regarding T cells and NK cells, it was found that tumor rejection in ani-

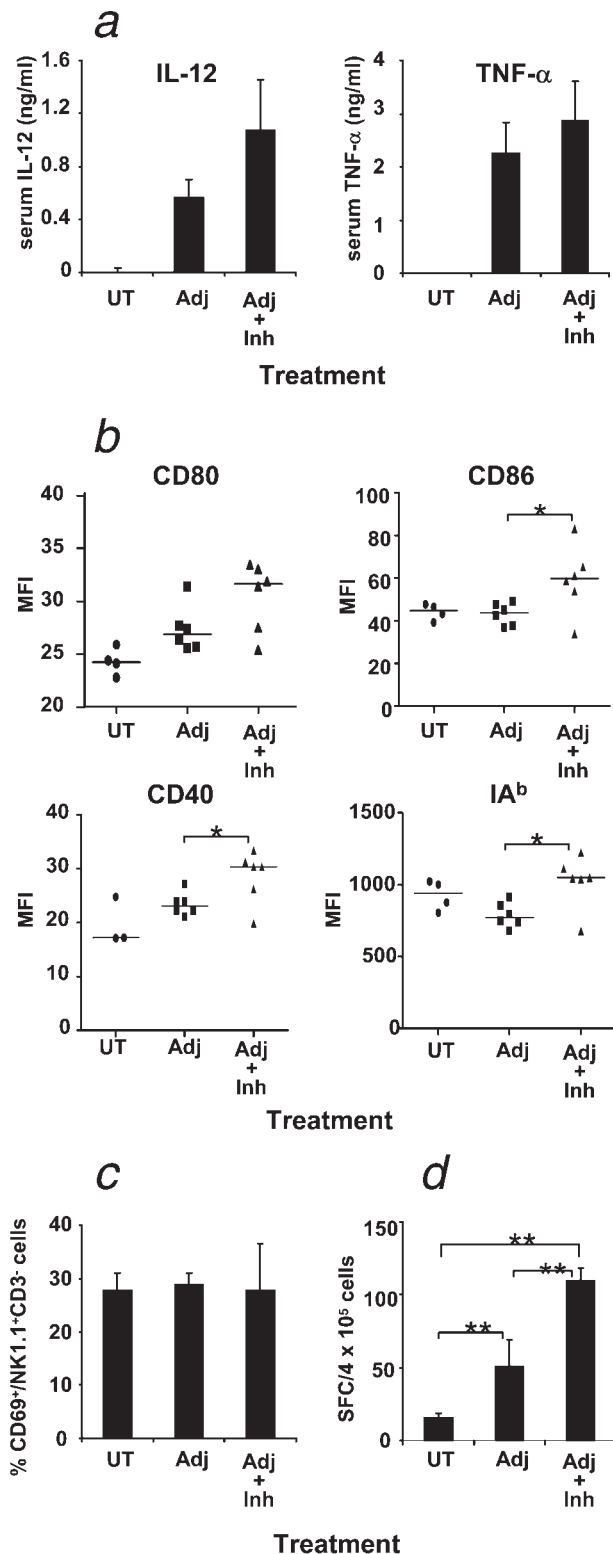


FIGURE 5 – Effect of TGF- β inhibitor peptides on antitumor innate immune responses. C57BL/6 mice (4–7 per group) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they were left untreated (UT), received a single i.t. administration of poly(I:C) and anti-CD40 (Adj), or adjuvants plus 4 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) in a 7-day interval (Adj + Inh). (a) Cytokines IL-12 and TNF- α were measured in the serum after treatment. (b) Lymph nodes were homogenized and cells were stained with anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD40-FITC and anti-I-A^b-PE labeled antibodies to analyze the expression of these maturation markers in the DC population, gated using anti-CD11c-APC labeled antibodies (* $p < 0.05$). (c) Spleens were homogenized and cell suspensions were stained with anti-CD69-FITC, anti-CD3-PE and anti-NK1.1-APC-labeled antibodies to measure the number of NK cells. (d) Cells were stimulated with the NK-sensitive YAC-1 cell line and IFN- γ -producing cells were measured by ELISPOT (** $p < 0.01$). Values correspond to mean \pm SEM, and they are representative of 2 different experiments.

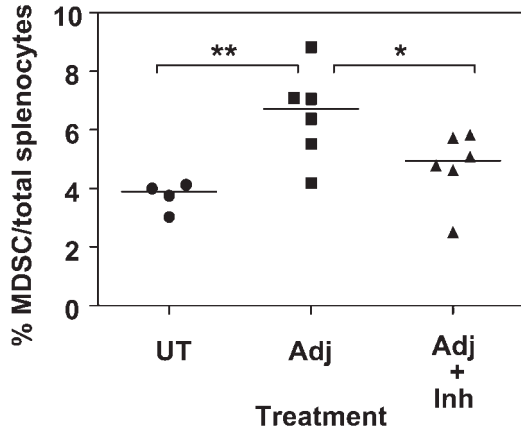


FIGURE 6 – Effect of TGF- β inhibitor peptides on myeloid-derived suppressor cells levels. C57BL/6 mice (4–6 per group) were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they were left untreated (UT), received a single i.t. administration of poly(I:C) and anti-CD40 (Adj), or adjuvants plus 4 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) in a 7-day interval (Adj +Inh). Then, spleens were homogenized and cells were stained with anti-Ly-6C-FITC, anti-IL-4R-PE and anti-CD11b-APC-labeled antibodies to measure the proportion of MDSC. MDSC were defined as cells positive for Ly-6C, IL-4R and CD11b. (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$)

mals treated with adjuvants and TGF- β inhibitors was associated with a higher activity of these cell populations. Indeed, higher IFN- γ production and lytic activity against tumor antigens and against NK-sensitive cells was observed in responding animals, whereas these responses were lower, or almost absent, in animals treated with adjuvants only. Surprisingly, despite these functional differences, the number of antigen-specific T cells measured using tetramers, or the number of NK cells, showed less pronounced differences between animals receiving adjuvants only or adjuvants plus TGF- β inhibitor peptides. These results suggest that administration of inhibitor peptides might help to eliminate the functional blockade exerted by TGF- β , allowing the induction of functional cell populations. Indeed, it has been described that in the case of DC, TGF- β impairs their functions.^{5,23} In a similar manner, in the case of effector cells, TGF- β inhibits expression of several cytolytic gene products in CD8⁺ T cells, including IFN- γ ,⁴¹ as well as the antitumor activity of NK cells.⁴² Also, it has been described that in some tumors, the lack of antitumor activity is not due to the absence of tumor-specific cells, but to the “dysfunctional” status of cells inhibited by immunosuppressive factors present in the tumor environment.⁴³ Thus, administration of TGF- β peptide inhibitors shows a great promise to rescue functional properties of cells relevant in immunotherapy.

In the present work, we have studied the effect of combined administration of adjuvants and TGF- β peptide inhibitors not only in cells involved in antitumor immunity but also on MDSC, a cell population that has been associated to poor antitumor responses.⁴⁴

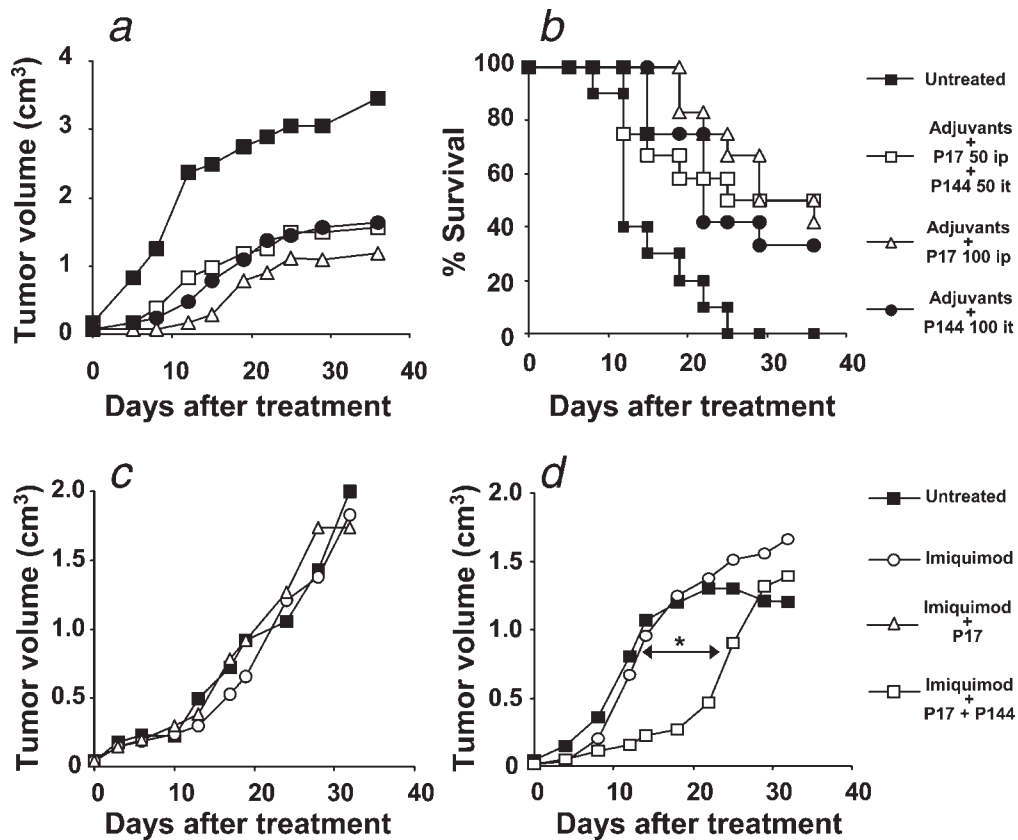


FIGURE 7 – Effect of different TGF- β inhibitor peptides on the efficacy of adjuvant immunotherapy. (a) C57BL/6 mice were injected s.c. with 5×10^5 E.G7-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5–6 mm, they were left untreated or treated with a single i.t. administration of adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus 10 administrations of peptides P17 (i.p.) and P144 (i.t.) (50 μ g each), P17 (i.p.; 100 μ g) or P144 (i.t.; 100 μ g) in a 20-day interval. Figures represent (a) mean of tumor volume in each group or (b) survival of mice. Results correspond to the sum of 2 independent experiments with 6 mice per group in each experiment. C57BL/6 mice ($n = 5-6$) were injected intradermally with 10^5 B16.OVA tumor cells and when tumor diameter reached 4–5 mm, they were left untreated or treated with 5 topical administrations of Imiquimod with or without 10 administrations of peptide P17 (i.p.; 100 μ g) (c) or P17 (i.p.) and P144 (i.t.) (50 μ g each) (d) in a 20-day interval. (* $p < 0.05$; Imiquimod + P17 + P144 vs. Imiquimod or untreated mice).

These cells are an important source of TGF- β ,³⁸ which confers tumors the capacity to escape from immune surveillance. However, no data is available on the role of TGF- β on the development of MDSC. We have found that, although adjuvant immunotherapy increases splenic MDSC levels, probably due to the inflammatory reaction,⁴⁵ mice coadministered with adjuvants and TGF- β peptide inhibitors show MDSC levels similar to those found in untreated animals, suggesting that inhibition of TGF- β may impair development and/or recruitment of these cells.

As discussed earlier, TGF- β may act in tumors as well as in lymphoid organs. For this reason, in most experiments, we gave a single dose of adjuvants and repeated administrations of 50 μ g of P144 i.t. and 50 μ g of P17 i.p. We then performed other experiments to study if both peptides were necessary to achieve similar efficacies. We first gave adjuvants plus 50 μ g of P144 or 50 μ g of P17, but because the efficacy of this strategy was not different from administering adjuvants only, doses were increased to 100 μ g. In this case, a statistically similar efficacy was attained respect to administering both peptides simultaneously. When the efficacy of P17 i.p. was analyzed in a second tumor model using the poorly immunogenic B16.OVA cells treated by administration of the adjuvant Imiquimod, no beneficial effect was observed. However, when using P17 i.p. and P144 i.t. in this model, tumor growth was inhibited during peptide administration period and a delay in tumor growth was attained. Analysis of tumor-infiltrating cells in untreated mice bearing E.G7-OVA or B16.OVA tumors has shown that, whereas in E.G7-OVA tumors 20% of infiltrating CD4⁺ cells are Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells), 50% of CD4⁺ infiltrating cells in B16.OVA tumors are Tregs (data not shown). This high number of tumor-infiltrating Tregs in the B16.OVA model may additionally require local inhibition of TGF- β , together with systemic inhibition attained by administering P17 i.p. These results suggest that the requirements for TGF- β inhibition may depend on the tumor model.

Because of the inhibitory role of Treg cells, several strategies have been proposed to block their effects to enhance the efficacy of cancer immunotherapy, most of them relying on depletion of this cell population.²⁰ However, depletion may lead to a homeostatic replenishment of these cells, and several depleting strategies use nonspecific Treg markers. Also, it has been shown that antibody-mediated depletion of Tregs may induce autoimmunity.⁴⁶ Thus, it has been recently proposed that Treg inhibition or their functional inactivation, rather than their depletion, might also help in cancer immunotherapy.⁴⁷ In this line, our strategy of TGF- β blockade contributes to downregulate an important inhibitory mechanism exerted by Tregs.⁵¹ Moreover, treatment with our TGF- β inhibitor peptides does not induce any sign of toxicity (data not shown), as in other reports using repeated anti-TGF- β antibody administration.²⁷ Pharmacokinetic studies performed with P144 in rodent models show a half-life of minutes for this peptide (J. Dotor; personal communication). This suggests that repeated administrations of P144 might be required to have a therapeutic effect, but at the same time may allow a finer control of TGF- β inhibition and concomitantly diminish potential side effects. Similar studies are ongoing with P17. Finally, although a clear enhancement in immune responses is observed, it cannot be discarded that the beneficial effect of TGF- β inhibition could be due to blockade of other TGF- β -induced mechanisms that promote tumor growth, such as tumorigenesis, metastasis and angiogenesis, as recently reported.⁴⁸

In conclusion, combination of immunotherapeutic strategies with peptide inhibitors of TGF- β is able to enhance the efficacy of immunotherapy. This enhancement takes places mainly by inhibiting the TGF- β produced by Treg cells, which concomitantly increases antitumor immune responses. These results suggest that these compounds may be useful for future clinical application in cancer immunotherapy.

References

- Kim IY, Kim MM, Kim SJ. Transforming growth factor-beta: biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:1-8.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146.
- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46-53.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:3855-60.
- Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ram-anathapuram LV, Arteaga CL, Akporiaye ET. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 2003;63:1860-4.
- Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, Fauci AS. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 1986;136:3916-20.
- Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005;202:1075-85.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1039-44.
- Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184:2417-22.
- Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A. Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1989;49:6972-5.
- Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, Kiso S, Yabuuchi I, Matsuda Y, Nishioka M, Tarui S. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991;51:4080-3.
- Niitsu Y, Urushizaki Y, Koshida Y, Terui K, Mahara K, Kohgo Y, Urushizaki I. Expression of TGF-beta gene in adult T cell leukemia. *Blood* 1988;71:263-6.
- Reed SG. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1999;1:1313-25.
- Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol* 1996;70:8624-9.
- Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1997;4:29-35.
- Kekow J, Wachsmann W, McCutchan JA, Cronin M, Carson DA, Lotz M. Transforming growth factor beta and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8321-5.
- Chang HL, Gillett N, Figari I, Lopez AR, Palladino MA, Derynck R. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells. *Cancer Res* 1993;53:4391-8.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:295-307.
- Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007;13:6247-51.
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:5262-70.
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919-29.

24. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Loning S, Teicher BA, Lee C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25⁻ T cells into CD4+CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:2883-92.
25. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 2003;3:630-41.
26. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:267-96.
27. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011-22.
28. Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortazar I, Bustos M, Penuelas I, Blanco G, Rodriguez C, Lechuga MC, Greenwel P, Rojkind M, Prieto J, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* 2003;22:12-20.
29. Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Pablos JL. Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 2005;125:450-5.
30. Dotor J, Lopez-Vazquez AB, Lasarte JJ, Sarobe P, Garcia-Granero M, Riezu-Boj JI, Martinez A, Feijoo E, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* 2007;39:106-15.
31. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huijbregtse IL, Casares N, Lopez-Vazquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, et al. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J Immunol* 2008;181:126-35.
32. Llopiz D, Dotor J, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. Combined immunization with adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:19-29.
33. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 1991;21:2891-4.
34. Rolink A, Melchers F, Andersson J. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity* 1996;5:319-30.
35. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 1988;54:777-85.
36. Brown DM, Fisher TL, Wei C, Frelinger JG, Lord EM. Tumours can act as adjuvants for humoral immunity. *Immunology* 2001;102:486-97.
37. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988;263:6407-15.
38. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003;198:1741-52.
39. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181:5791-802.
40. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M. TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004;173:6526-31.
41. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369-80.
42. Witham TF, Villa L, Yang T, Pollack IF, Okada H, Robbins PD, Chambers WH. Expression of a soluble transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor reduces tumorigenicity by regulating natural killer (NK) cell activity against 9L gliosarcoma in vivo. *J Neurooncol* 2003;64:63-9.
43. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:419-24.
44. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2006;16:53-65.
45. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2008;181:4666-75.
46. Wei WZ, Jacob JB, Zielinski JF, Flynn JC, Shim KD, Alsharabi G, Giraldo AA, Kong YC. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res* 2005;65:8471-8.
47. Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:880-7.
48. Nam JS, Terabe M, Mamura M, Kang MJ, Chae H, Stuelten C, Kohn E, Tang B, Sabzevari H, Anver MR, Lawrence S, Danielpour D, et al. An antitransforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res* 2008;68:3835-43.

Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-10 by TGF β 1 in Melanoma Enhances Tumor Infiltration and Immunosuppression

Nancy Díaz-Valdés¹, María Basagoiti¹, Javier Dotor², Fernando Aranda¹, Iñaki Monreal¹, José Ignacio Riezu-Boj¹, Francisco Borrás-Cuesta¹, Pablo Sarobe¹, and Esperanza Feijó²

Abstract

Melanoma progression is associated with the expression of different growth factors, cytokines, and chemokines. Because TGF β 1 is a pleiotropic cytokine involved not only in physiologic processes but also in cancer development, we analyzed in A375 human melanoma cells, the effect of TGF β 1 on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-10 (IL-10) expression, two known factors responsible for melanoma progression. TGF β 1 increased the expression of MCP-1 and IL-10 in A375 cells, an effect mediated by the cross-talk between Smad, PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT, and BRAF-MAPK (mitogen activated protein kinase) signaling pathways. Supernatants from TGF β 1-treated A375 cells enhanced MCP-1-dependent migration of monocytes, which, in turn, expressed high levels of *TGF β 1*, *bFGF*, and *VEGF* mRNA. Moreover, these supernatants also inhibited functional properties of dendritic cells through IL-10-dependent mechanisms. When using *in vitro*, the TGF β 1-blocking peptide P144, TGF β 1-dependent Smad3 phosphorylation, and expression of MCP-1 and IL-10 were inhibited. *In vivo*, treatment of A375 tumor-bearing athymic mice with P144 significantly reduced tumor growth, associated with a lower macrophage infiltrate and decreased intratumor MCP-1 and VEGF levels, as well as angiogenesis. Finally, in C57BL/6 mice with B16-OVA melanoma tumors, when administered with immunotherapy, P144 decreased tumor growth and intratumor IL-10 levels, linked to enhanced activation of dendritic cells and natural killer cells, as well as anti-OVA T-cell responses. These results show new effects of TGF β 1 on melanoma cells, which promote tumor progression and immunosuppression, strongly reinforcing the relevance of this cytokine as a molecular target in melanoma. *Cancer Res*; 71(3); 812–21. ©2011 AACR.

Introduction

TGF β 1 is a pleiotropic cytokine that plays a relevant role in the progression of cancer due to its effect on cell proliferation, angiogenesis, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis (1). Also, it has been described that TGF β 1 induces the expression of integrins and alters the composition of extracellular matrix by activating the production of matrix metalloproteinases, which favor the invasion of tumor cells. Moreover, TGF β 1 enhances angiogenesis by activating the expression of proangiogenic factors such as interleukin (IL)-8 and VEGF (2). This molecule also exerts immunoregulatory

functions by inhibiting proliferation, activation, and differentiation of lymphocytes (3) as well as the function of natural killer (NK) cells (4) and dendritic cells (DC; ref. 5), which leads to the suppression of the antitumor immune response.

TGF β 1 has been described as an important factor in the development of melanoma. Although it has antiproliferative effects on premalignant cells, as that occurs in normal melanocytes, advanced melanoma cells become resistant to this suppressive effect and they can use TGF β 1 to enhance their invasive and metastatic phenotype (6). Tumor cells evade the suppressive effect of TGF β 1 through receptor- or Smad-inactivating mutations (7, 8) or by downstream signaling alterations. These modifications avoid the suppressive pathway and induce prometastatic processes (9). Although no genetic mutations of TGF β 1 classical signaling molecules have been identified in melanoma, a cross-talk between the Smad signaling pathway and other pathways, including Ras/MEK [MAP/extracellular signal regulated kinase (ERK) kinase]/ERK, and Akt, which are constitutively activated in a large percentage of cutaneous melanomas, has been described (2, 10).

The majority of malignant melanoma cells overexpress different growth factors and cytokines, which enhance growth rate and invasiveness by their autocrine and paracrine effects

Authors' Affiliations: ¹Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada, Área de Hepatología y Terapia Génica; and ²DIGNA Biotech, Pamplona, Spain

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Esperanza Feijó, DIGNA Biotech, Pío XII 22, 31008 Pamplona, Spain. Phone: 34-948-194700; Fax: 34-948-194717; E-mail: feijoe@unav.es

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2698

©2011 American Association for Cancer Research.

(11). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a potent chemokine that recruits macrophages, is expressed by malignant but not by normal melanocytes (12). Accordingly, a common feature of melanoma is the infiltration of monocyte/macrophages. These cells produce factors, which may help tumor invasion, as well as the production of angiogenic factors, which facilitate the formation of a vascular bed that can support tumor development (13). Another factor common in melanoma is IL-10. Its expression has been shown *in vitro* in many melanoma cell lines (14), and *in vivo*, in primary and in metastatic melanoma lesions (15). Moreover, elevated levels of IL-10 have been observed in the sera of patients with advanced melanoma and correlate with tumor progression (16).

Because TGFβ1 has been shown to increase melanoma progression and enhance its aggressive phenotype, due to the important effects of MCP-1 and IL-10 have on melanoma malignancy, we hypothesized that TGFβ1 might play a role on the expression of these molecules in melanoma cells. Thus, we studied the effect of TGFβ1 on A375 melanoma cells by measuring the expression of MCP-1 and IL-10 as well as the consequences that expression of these factors had on melanoma progression. Moreover, the signaling pathways involved in the TGFβ1-induced MCP-1 and IL-10 expression were also studied. Finally, as described in more detail in the following text, we showed that P144, a peptide inhibitor of TGFβ1, had beneficial effects *in vitro* and *in vivo*, by inhibiting TGFβ1-induced mechanisms associated with melanoma development and immunosuppression.

Materials and Methods

Cell lines

Cell lines A375 and YAC-1 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were thawed and passaged according to ATCC guidelines for less than 6 months from the time that they were received or thawed. The ATCC authenticates cell lines by DNA fingerprinting by short tandem repeat analysis. B16-OVA cells were obtained from Dr. G. Kroemer (Paris, France) in 2009. No authentication was done, but the expression of OVA antigen and MHC-I molecules was tested before the experiments. Cell lines were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco), 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (Gibco), 1.5 g/L sodium bicarbonate (Sigma), and 4.5 g/L glucose (Sigma).

Stimulation of A375 cells with TGFβ1

A375 cells were cultured in 96-well plates (3×10^4 per well) and stimulated with TGFβ1 (R&D Systems; 1 ng/mL) in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. After 24 to 48 hours, supernatants were harvested to measure MCP-1 and IL-10. In some experiments, TGFβ1 was preincubated at 37°C for 1 hour with anti-human TGFβ1 (1 μg/mL), rat IgG control isotype (BD-Pharmingen), the TGFβ1 inhibitor peptide P144 (50–200 μg/mL; ref. 17) or a control 15-mer peptide (P301; NNTRKRIRIQRGPGR) that does not bind to TGFβ1 (both from NeomPS). To determine the signaling pathways involved in the production of MCP-1 and IL-10 by A375 cells,

Smad3 inhibitor SIS3 (Calbiochem), mitogen activated protein kinase (MAPK)/ERK1/2 inhibitor U0126 (Promega), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-specific inhibitor LY294002 (Calbiochem), all at 10 μmol/L, or DMSO were preincubated with A375 cells 30 minutes before the addition of TGFβ1. Expression of phosphorylated forms of Smad3, AKT, and ERK1/2 induced by TGFβ1 (2 ng/mL) was assessed by Western blotting in A375 lysates from cells cultured in 6-well plates (3×10^5 per well) in serum-free DMEM for 1 hour. In some experiments, TGFβ1 was preincubated at 37°C for 1 hour with P144 or control peptide (50–200 μg/mL).

Generation of melanoma conditioned medium from stimulated A375 cells

Melanoma conditioned media from A375 cells treated with or without TGFβ1 (TGFβ-MCM and MCM, respectively) used in functional *in vitro* experiments with monocytes and monocyte-derived DCs were produced by culturing A375 cells in 6-well plates (2.5×10^5 per well) in DMEM with or without TGFβ1 (2 ng/mL) for 24 hours. Then, cells were washed twice with medium to remove TGFβ1 and maintained in culture for an additional 48 hours.

Western blot analysis

One hour after cell stimulation with TGFβ1 as described earlier, cells were washed with PBS, lysed with RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostic GmbH), and precipitated proteins (30 μg) were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels. After transference onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad), nonspecific binding was blocked with 10% nonfat milk in 10 mmol/L Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20. Phosphorylated Smad3, AKT, and ERK1/2 were detected using rabbit polyclonal antibodies anti-phospho Smad3 (1:1,000; Chemicon), AKT (1:1,000; Cell Signaling), and MAP kinase 1/2 (ERK1/2; 1:1,000; Cell Signaling). Actin was also analyzed for control evaluation with rabbit anti-actin (1:2,000; Sigma-Aldrich) antibodies. Finally, an ECL anti-rabbit IgG linked to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) plus the Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostic GmbH) was used to develop the proteins bands in films scanned with the Curix-60 (AGFA).

Monocyte migration assay

Monocytes were obtained from peripheral blood mononuclear cells by positive selection with CD14-coated beads (Miltenyi). In all cases, peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy donors after informed consent, following a protocol in accordance with the Declaration of Helsinki. Then, monocytes (5×10^5) were plated in 100 μL of complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin) in the top chamber of 5-μm pore membrane Transwells (Costar), with 5 μg/mL rat anti-human MCP-1 antibody (R&D Systems) or rat IgG control isotype (BD-Pharmingen) when required. The bottom chamber was filled with 500 μL of DMEM, MCM, or TGFβ1-MCM. In some cases, melanoma conditioned media were incubated with

anti-human MCP-1 antibody or rat IgG for 1 hour at 37°C prior to the addition of media to Transwell plates. After 4 hours, the number of monocytes in the lower chamber was counted by flow cytometry as described (18).

Culture of DCs in TGFβ1-MCM

Monocyte-derived DCs obtained as described (18) were cultured in 96-well plates (10^5 in 200 μL per well) in RPMI with DMEM, MCM, or TGFβ1-MCM (proportion 4:1) for 6 hours. Then, DCs were stimulated with lipopolysaccharide (LPS; 1 μg/mL; Sigma-Aldrich) and after 24 hours, production of TNFα and IL-12 was measured in culture supernatants by ELISA. The role of IL-10 was assessed by preincubating MCM with rat anti-human IL-10 monoclonal antibody (Bioscience) or control isotype (BD-Pharmingen; 1 μg/mL) before their addition to DC cultures.

Mixed leukocyte reaction

Mixed lymphocyte reactions (MLR) were carried out by stimulating in 96-well plates nonadherent (CD14⁻) cells (2×10^5 per well) obtained from healthy donors with 10^4 allogeneic DCs for 5 days. DCs were previously matured with LPS (1 μg/mL) in the presence of A375 MCM (4:1) or TGFβ1-MCM (4:1) for 24 hours. Cells were pulsed with 0.5 μCi per well of [³H]thymidine for the last 18 hours and proliferation was measured. To measure the production of IFNγ by stimulated lymphocytes, 100 μL of culture supernatants was harvested on day 3.

ELISA

Human or murine TGFβ1, MCP-1, IL-10, VEGF, TNFα, IL-12, and IFNγ from tumor homogenates, serum, or supernatants of DC, NK, or T-cell cultures were measured by ELISA kits (BD Biosciences) following the manufacturer instructions.

RT-PCR

Monocytes and DC ($1 \times 10^5/200$ μL per well) were cultured for 24 hours in 96-well plates in RPMI with DMEM, MCM, or TGFβ1-MCM (proportion 1:1). Total RNA extraction from cultures and real-time PCR were carried out as described (19) using specific primers for each gene (Table 1). Results were normalized according to β-actin. The amount of each transcript was expressed by the formula: $2^{-\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct(\beta\text{-actin}) - Ct(\text{gene})$].

Treatment of tumor-bearing mice with P144

Inhibition of TGFβ1 effect on melanoma progression was determined in 6- to 8-week-old female, athymic, nude-Foxn1^{nu} and in C57BL/6 mice (Harlan). They were maintained in specific pathogen-free conditions and treated according to guidelines of our institution after study approval by the review committee. A375 cells (10^6) were injected subcutaneously into the right flank of athymic nude mice and when the tumor diameter reached 5 mm, animals were treated intraperitoneally with P144 (100 μg per mouse) or vehicle (PBS) daily during 21 days. Tumor size was monitored and animals were sacrificed when tumors reached 15 mm. Tumor volume (*V*) was calculated as follows: $V = (1/2)ab^2$, where *a* and *b* are the longest and shortest tumor diameters, respectively.

C57BL/6 mice were injected intradermally with 10^5 B16-OVA cells and when the tumor diameter reached 5 mm (day 0), they received an intratumor injection of OVA (500 μg), poly(I:C) (50 μg), and agonistic anti-CD40 antibodies (50 μg). On days 2 and 4, they were injected only with poly(I:C) and anti-CD40. P144 (100 μg per mouse) or vehicle was administered daily intraperitoneally from day 0 to day 7. At day 7, they were sacrificed for immunologic assays.

Immunohistochemical analysis of tumors

A375 tumor-bearing athymic mice, treated daily with P144 or vehicle, were sacrificed after 8 days of treatment. Tumors were resected and macrophage infiltrate was studied by immunohistochemical analysis. Tumor sections were incubated for 2 hours with rat anti-F4/80 antibody (1:400; eBiosciences) at 4°C overnight, followed by incubation with 1:200 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG antibody (DakoCytomation) during 30 minutes. Finally, peroxidase activity was visualized using DAB⁺ Chromogen (DakoCytomation) as a substrate and sections were counterstained with Harris hematoxylin. Macrophage infiltrate was measured by counting the number of pixels corresponding with immunostained cells from digital images using the Adobe Photoshop CS3 program as described (20).

Angiogenesis

Tumor angiogenesis was also analyzed in nude mice by injecting A375 tumor cells (10^6) mixed with Matrigel. Seven

Table 1. Primer sequences

Gene	Sense primer	Antisense primer
<i>TGFβ1</i>	TGCTAATGGTGGAAACCCAC	ATCGCCAGGAATTGTTGCTG
<i>bFGF</i>	ACCGTTACCTGGCTATGAAG	CTGGTGTATTCCTTGACCG
<i>VEGF</i>	CTGCTGTCTTGGGTGCATTGG	CACCGCCTCGGCTTGTCACA
<i>COX-2</i>	CAAAAGCTGGGAAGCCTTCTC	CCTCGCTATGATCTGTCTTG
<i>PDL-1</i>	ACAAGCAGTGACCATCAAG	AGAGGTAGTTCTGGGATGAC
<i>IDO</i>	TGGCACACGCTATGGAAAAC	ATGCATCCCAGAACTAGACG

days later, plugs were dissected and hemoglobin content was measured as described (21). In some experiments, mice received 35 μg of anti-MCP-1 neutralizing antibodies (R&D Systems) or isotype control (BioXcell) 1, 4, and 6 days after tumor inoculation.

IFNγ production by murine T cells

IFNγ production by T cells was measured by ELISA after a 2-day stimulation in 96-well plates of splenocytes (4×10^5) with the CD8 epitope OVA(257–264; 1 μg/mL).

Statistical analysis

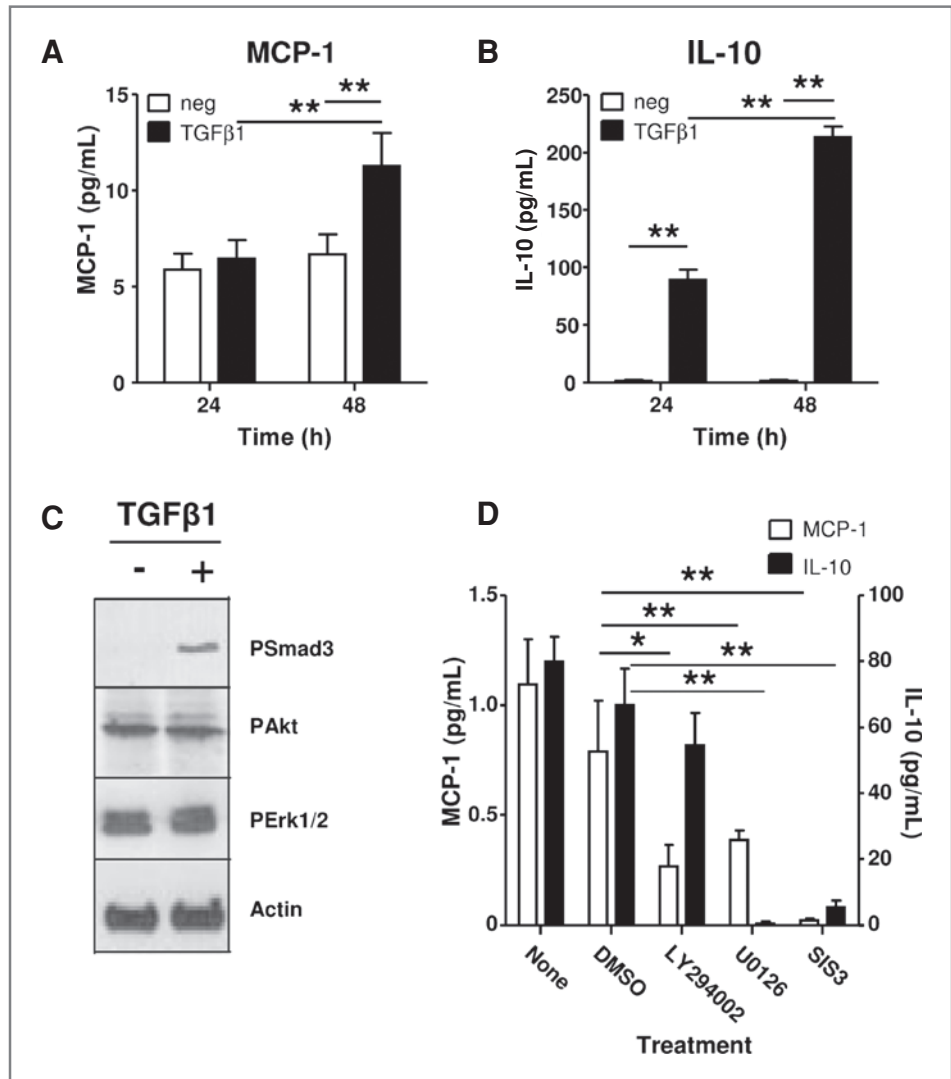
Data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney test with the GraphPad software program. Survival curves of animals treated with different protocols were plotted according to the Kaplan–Meier method and were compared using the log-rank test. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Results

TGFβ1 increases MCP-1 and IL-10 expression in A375 cells by the cross-talk between Smad, AKT, and MAPK/ERK signaling pathways

To study the effect of TGFβ1 on MCP-1 and IL-10, two known factors associated with melanoma progression, A375 melanoma cells were treated with this cytokine. Although this cell line does not produce TGFβ1 *in vitro* (data not shown), we found that it can be detected both in A375 tumor homogenates (181 ± 77 pg/mg of protein) and in the serum of A375 tumor-bearing athymic mice (13.5 ± 2.3 ng/mL vs. 7.3 ng/mL in control mice). Although MCP-1 was constitutively expressed by A375 cells, the addition of TGFβ1 significantly increased its expression after 48 hours of culture (Fig. 1A). No detectable expression was found in untreated cultures in the presence of IL-10, whereas a clear induction was observed at 24 and 48 hours in the presence of TGFβ1 (Fig. 1B).

Figure 1. Effect of TGFβ1 on the expression of MCP-1 and IL-10 in A375 melanoma cells. A and B, A375 cells (3×10^4 per well) were stimulated with TGFβ1 (2 ng/mL) during 24 and 48 hours. Supernatants ($n = 6$ per group) were then collected to analyze MCP-1 and IL-10 concentrations by ELISA. Results are expressed as the mean + SEM. **, $P < 0.01$. neg, negative. C, A375 melanoma cells were stimulated with TGFβ1 (1 ng/mL) for 1 hour and phosphorylation of Smad3, AKT, and ERK1/2 was determined by Western blotting. Actin expression was analyzed as the control. D, effect of inhibiting Akt (LY294002), ERK (U0126), and Smad3 (SIS3) on the production of MCP-1 and IL-10 in A375 cells stimulated with TGFβ1 (1 ng/mL). DMSO was used as a control. Results are expressed as the mean + SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. One representative experiment of at least 3 independent experiments is shown.



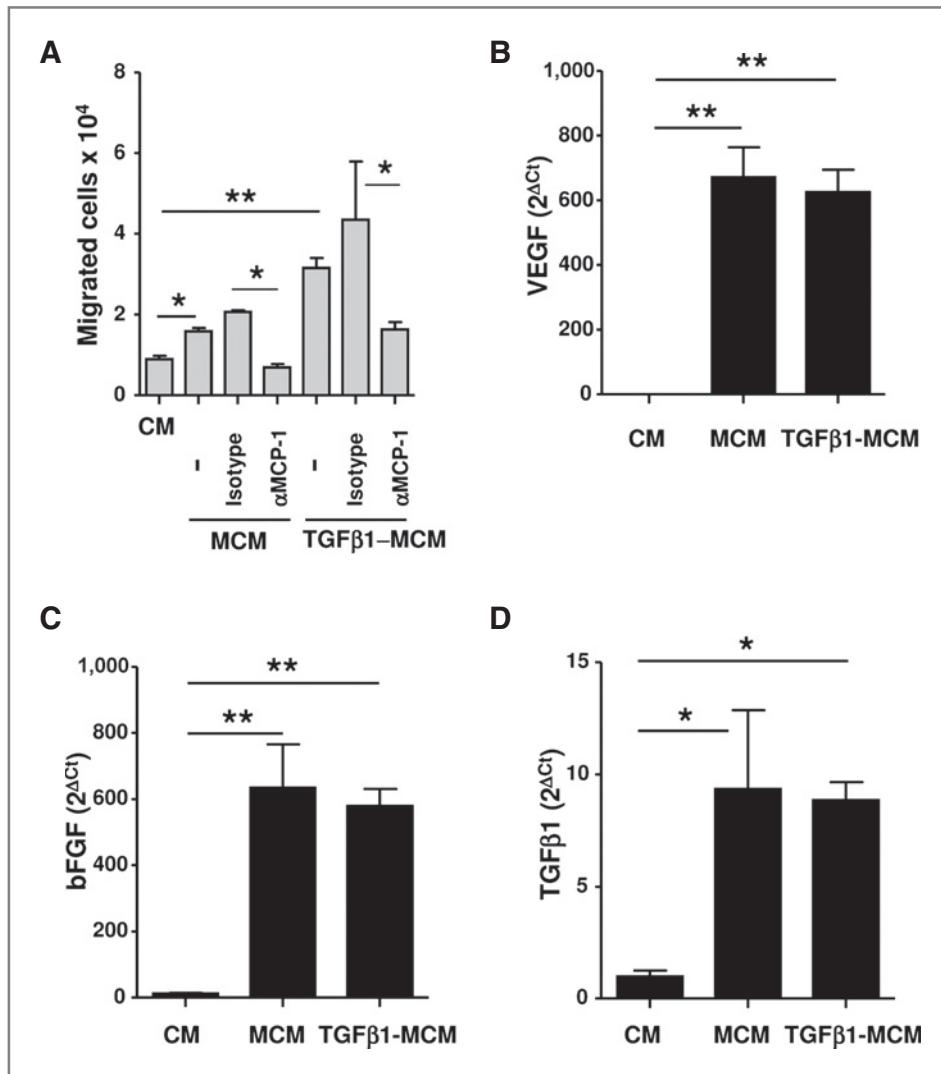


Figure 2. Effect of melanoma conditioned medium from TGFβ1-treated A375 cultures on monocytes. A, monocyte migration in the presence of culture medium (CM), MCM, or TGFβ1-MCM from A375 cells was studied using Transwell chambers ($n = 6$ per group) after 6 hours of incubation. In some cases, anti-human MCP-1 or control antibodies were added. B–D, mRNA expression of VEGF, bFGF, and TGFβ1 in monocytes cultured during 1 day in the presence of CM, MCM, or TGFβ1-MCM. Results are expressed as the mean + SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. One representative experiment of 2 independent experiments is shown.

To characterize signaling pathways involved in the induction of these factors, Western blot experiments were carried out to measure phosphorylation of Smad3 as well as AKT and ERK1/2 kinases. It was found that in A375 cells, TGFβ1 induced phosphorylation of the canonical pathway molecule Smad3 but no increase in phosphorylated AKT and ERK kinases over basal constitutive levels was observed (Fig. 1C). However, by using specific inhibitors of Smad3 (SIS3), PI3K/AKT (LY294002), and MAPK/ERK (U0126) during stimulation experiments, it was found that MCP-1 production was dependent on all 3 molecules whereas IL-10 production depended on Smad3 and MAPK/ERK-related pathways (Fig. 1D).

TGFβ1 enhances MCP-1-mediated monocyte migration

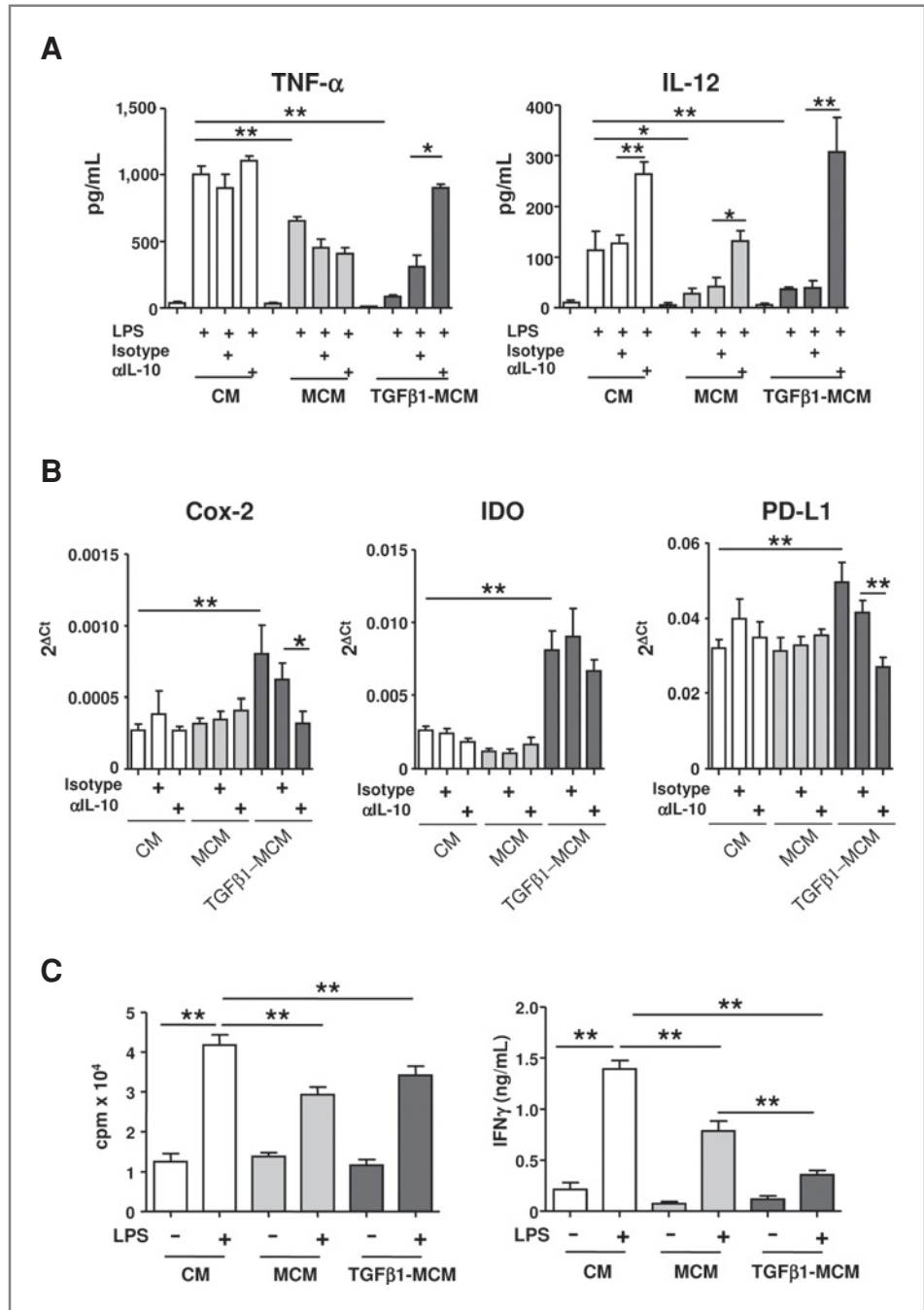
Because TGFβ1 increased the production of MCP-1 in A375 cells, we tested whether MCM from A375 cell cultures could enhance monocyte migration. *In vitro* Transwell experiments showed that TGFβ1-MCM from A375 cells had a higher chemoattractive activity on monocytes than that observed

with MCM from untreated A375 cells or complete medium (DMEM), an MCP-1-dependent effect (Fig. 2A). To evaluate the relevance of an increase in intratumor monocyte infiltration mediated by TGFβ1, we measured the expression of VEGF and bFGF in monocytes, two essential factors involved in the progression of melanoma. Interestingly, MCM and TGFβ1-MCM induced a similar increase in mRNA expression of both proangiogenic factors (Fig. 2B and C). Moreover, culture supernatants from untreated or TGFβ1-stimulated A375 cells increased the expression of TGFβ1 mRNA in monocytes (Fig. 2D). Thus, although TGFβ1 does not directly enhance the ability of monocytes to produce angiogenic factors, it may enhance the proangiogenic environment by increasing the number of infiltrating monocytes, a similar phenomenon as that described for smooth muscle cells (22, 23).

Inhibition of DC functions by TGFβ1-induced IL-10

Although TGFβ1-induced IL-10 may have an autocrine stimulatory effect on melanoma cells by increasing their proliferation (24), it may also behave as a suppressor factor,

Figure 3. Inhibition of DC functions by melanoma conditioned medium from TGFβ1-treated A375 cultures. A, DCs were preincubated in 96-well plates (*n* = 6 per group) with culture medium (CM), MCM, or TGFβ1-MCM from A375 cells for 6 hours and then stimulated for 24 hours with LPS. In some cases, anti-human IL-10 or control antibodies were added. Supernatants were harvested and TNFα and IL-12 levels were measured by ELISA. B, mRNA was obtained from DCs treated as in A and expression of immunosuppressive molecules COX-2, IDO, and PD-L1 was measured by quantitative real-time PCR. C, DCs treated as previously were used to stimulate allogeneic lymphocytes in MLR experiments and proliferation and IFNγ production were studied to measure lymphocyte activation. Results are expressed as the mean ± SEM. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01. Representative experiments of 2 or 3 independent experiments are shown. cpm, counts per million.



mainly for antigen-presenting cells. We thus measured the effect that the addition of TGFβ1 to tumor cells had on the activation of DCs, a cell population that links innate and adaptive immunity and activates antitumor immunity. An inhibition on LPS-induced TNFα and IL-12 production was observed after pretreatment of DCs with MCM, which was stronger when using TGFβ1-MCM, as compared with culture medium (Fig. 3A). The inhibitory effect of TGFβ1-MCM was restored by anti-IL-10 blocking antibodies, confirming the important role of IL-10 as a suppressive factor in TGFβ1-MCM.

Similarly, TGFβ1-MCM induced upregulation of immunosuppressive molecules such as enzymes COX-2 and IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase) and the membrane molecule PD-L1 (Fig. 3B). In this case, upregulation of COX2 and PD-L1 was dependent on IL-10 whereas IDO expression depended on other TGFβ1-induced unknown factors.

We finally studied the ability of these DCs to activate T lymphocytes. Although DCs treated with MCM, with or without TGFβ1, had a lower capacity to induce allogeneic T-cell proliferation, a higher inhibition in IFNγ production was observed when using DCs treated with TGFβ1-MCM

(Fig. 3C), in agreement with the lowest levels of IL-12 produced by these DCs.

In vitro and in vivo antitumor effects of the TGF-β1 inhibitor peptide P144

Because TGFβ1 plays an important role in the induction of factors relevant for melanoma progression, we analyzed the *in vitro* and *in vivo* effects of the TGFβ1 inhibitor peptide P144 (17). *In vitro* analysis of the classical TGFβ1 signaling pathway showed that phosphorylation of Smad3 in A375 cells was decreased after treatment with P144 (Fig. 4A). Accordingly, TGFβ1-induced MCP-1 and IL-10 production in A375 cell cultures was specifically inhibited by this peptide (Fig. 4B).

Because of the inhibitory effects that P144 had on A375 cells *in vitro*, we tested this peptide in *in vivo* tumor models. We first implanted A375 cells subcutaneously in athymic mice, and when tumor diameter reached 5 mm, animals were given P144 injections daily for 3 weeks. TGFβ1 is detected both in the serum of these animals and in tumor homogenates, suggesting that this cytokine could be relevant in this *in vivo* model and susceptible to be considered a target. A significant delay in

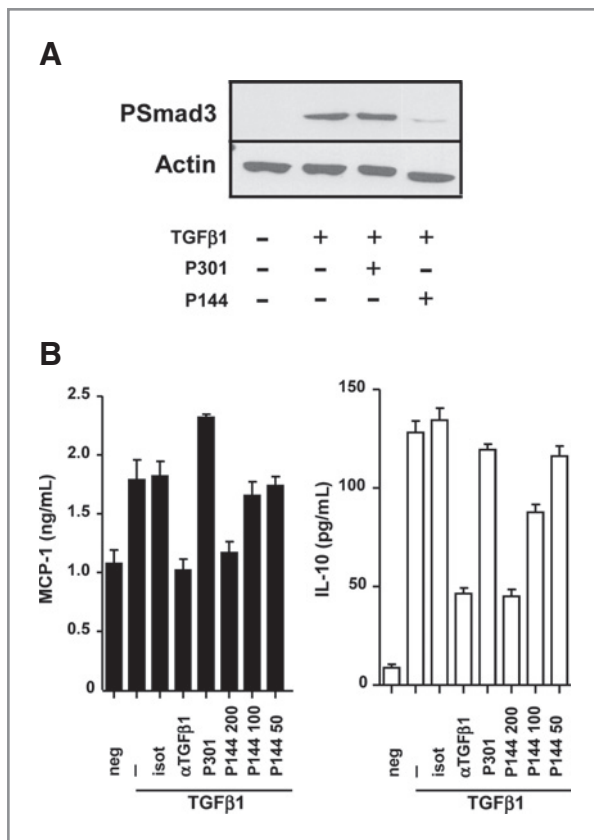


Figure 4. *In vitro* effects of the TGFβ1 inhibitor peptide P144. A, A375 cells were stimulated with TGFβ1 for 1 hour in the presence of TGFβ1 inhibitor peptide P144 or control peptide P301, and Smad3 phosphorylation was measured by Western blotting. B, A375 cells were stimulated in 96-well plates (*n* = 6 per group) for 48 hours with TGFβ1 in the presence of P144, control peptide P301, or anti-TGFβ1 antibodies, and MCP-1 and IL-10 production was measured by ELISA. Representative results of 4 independent experiments are shown. neg, negative; iso, isotype.

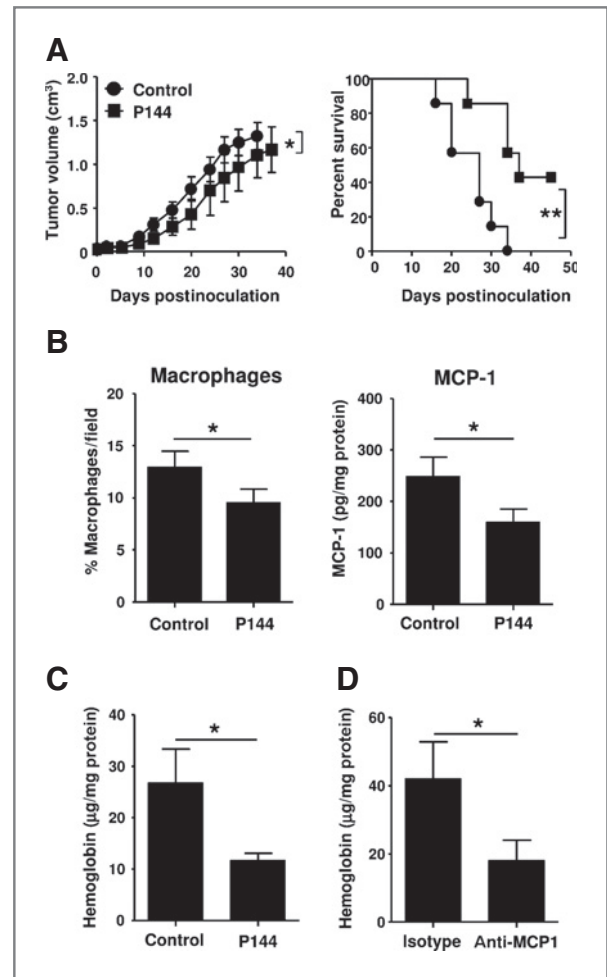


Figure 5. *In vivo* effect of TGFβ1 inhibitor peptide P144 on A375 tumor growth and angiogenesis. A, athymic mice (*n* = 6–8 per group) bearing subcutaneous A375 melanoma tumors were treated daily during 21 days with P144 peptide or vehicle, and tumor growth and animal survival were monitored. B, macrophage infiltrate, evaluated by counting F4/80 positive cells, and MCP-1 content in homogenates were analyzed in tumors from mice treated for 8 days as in A. C, angiogenesis, measured as hemoglobin content, was evaluated in mice injected with Matrigel plugs containing A375 cells and treated with P144 or control vehicle for 7 days. D, angiogenesis was evaluated as previously in mice injected with Matrigel plugs containing A375 cells and treated with or without anti MCP-1 neutralizing antibodies. Data are representative of 1 of 2 to 3 independent experiments. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

tumor growth and enhanced survival was observed in those mice treated with P144 (Fig. 5A). They also had a lower number of tumor-infiltrating macrophages, associated with lower MCP-1 levels (Fig. 5B). A similar decrease in MCP-1 levels was also observed in the serum (Supplementary Fig. S1A). Moreover, treatment with P144 reduced intratumor VEGF levels (Supplementary Fig. S1B) and inhibited tumor angiogenesis, measured as a hemoglobin content (Fig. 5C) or CD31 staining (Supplementary Fig. S1C). Finally, *in vivo* inhibition of MCP-1 with neutralizing antibodies decreased tumor angiogenesis, showing the role of this chemokine in this tumor model (Fig. 5D).

The immunosuppressive effect of TGFβ1 was studied in immunocompetent C57BL/6 mice bearing B16-OVA melanoma tumors, in which the production of TGFβ1 (25) and IL-10 (26) has been reported. Although treatment of tumor-bearing mice with OVA antigen plus adjuvants poly(I:C) and anti-CD40 delayed tumor growth, combination of this treatment with P144 promoted a higher tumor growth inhibition (Fig. 6A). This decreased tumor growth was associated with lower intratumor IL-10 (Fig. 6B). The analysis of innate immunity in the spleen of tumor-bearing mice showed that P144 enhanced the proportion of activated CD86⁺ DCs induced by immunotherapy, as well as the activity, measured as IFNγ production, of NK cells (Supplementary Fig. S2). Moreover, splenic T cells from P144-treated mice produced higher IFNγ levels after stimulation with the CD8⁺ epitope

OVA(257–264) (Fig. 6C). This enhanced activation of innate and adaptive immunity resulted in higher intratumor levels of IFNγ (Fig. 6D).

Discussion

In the present study, we showed that TGFβ1 enhances the production of MCP-1 and IL-10 by A375 melanoma cells, two factors associated with the progression of this malignancy (27). It has been described that MCP-1 increases tumor-associated monocyte/macrophages, leading to a higher degree of angiogenesis (28). Moreover, IL-10 has been detected as elevated levels in sera from patients with melanoma and is associated with a shorter survival rate in advanced melanoma patients (16). However, to our knowledge, the present work is the first to report the induction of MCP-1 and IL-10 by TGFβ1 in melanoma cells. Preliminary experiments, carried out using primary tumor lines obtained from patients with metastatic melanoma, have also shown an increase in MCP-1 induction by TGFβ1 (E. Feijoo, unpublished results), which confirms the clinical relevance of this finding.

Cross-talk between different signaling pathways has been described to explain the effect of TGFβ1 on different factors related to cancer progression. Besides the TGFβ1-Smad pathway, several groups have also observed the TGFβ1-mediated activation of Smad-independent pathways (29–31). We have determined that TGFβ1-dependent Smad3 phosphorylation is responsible for the MCP-1 increase and IL-10 induction in A375 cells. Because IL-10 is induced by TGFβ1 and it has been previously described that MAP/ERK signaling pathway was implicated in the expression of IL-10 mRNA in A375 cells (32), we hypothesized that this signaling pathway could interact with the Smad3 signaling pathway induced by TGFβ1. We have shown that the MAP/ERK1/2 pathway, which is constitutively activated in this melanoma cell line due to the BRAF^{V600E} mutation, a mutation detected in 66% of melanomas (33), is not activated by TGFβ1. However, using specific inhibitors, we found that both Smad3 and MAP/ERK1/2 pathways were essential for the expression of IL-10. We have also found that A375 cells show constitutive expression of IL-8, a factor dependent on the MAPK/ERK1/2 pathway but independent on TGFβ1 (data not shown). Because PI3K/AKT signaling supports the survival of melanoma cells (34) and has been implicated in the progression of human melanoma (35), we tested the role of this pathway in the production of MCP-1 and IL-10. Even though TGFβ1 has no effect on the phosphorylation of AKT, by using a specific inhibitor of PI3K, we observed that MCP-1 production by A375 cells is triggered by this signaling pathway as well as by the Smad3 and MAPK/ERK signaling pathways. These results suggest the existence of a downstream cross-talk between Smad3, PI3K/AKT, and MAP/ERK1/2 signaling pathways in the expression of MCP-1 and IL-10 in A375 melanoma cells.

Besides the direct effects of TGFβ1 on tumor cells, our studies show new indirect mechanisms induced by TGFβ1 that facilitate melanoma progression. Indeed, TGFβ1-dependent upregulation of MCP-1 resulted in a higher attraction of monocytes, which have been conditioned by tumor cells to

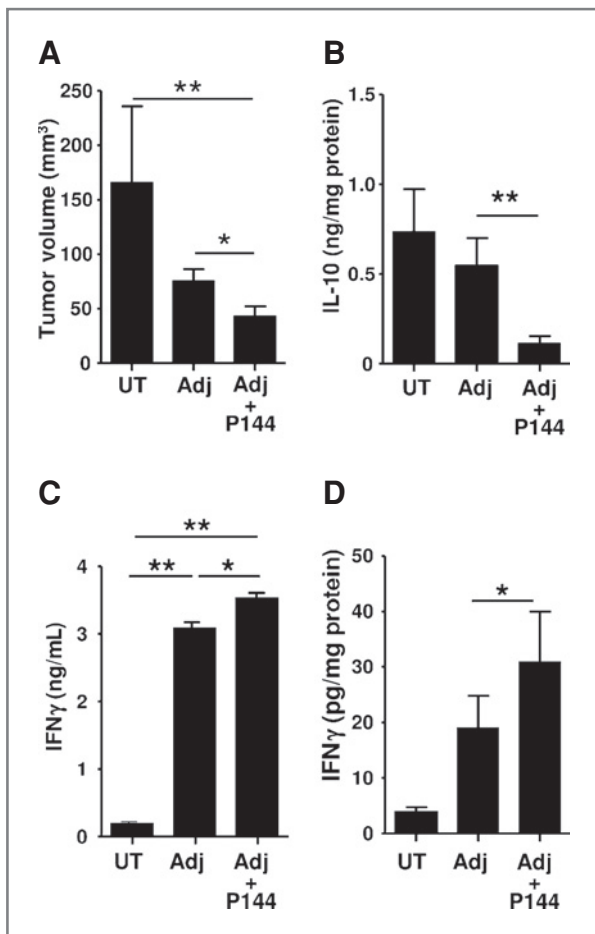


Figure 6. *In vivo* effect of TGFβ1 inhibitor peptide P144 on B16-OVA tumor growth and immune response. C57BL/6 ($n = 6-8$ mice per group) bearing subcutaneous B16-OVA tumors were treated with immunotherapy (Adj; OVA plus poly(I:C) and anti-CD40) with or without P144 or left untreated. At day 7, tumor volume (A) and intratumor IL-10 content (B) were evaluated. C, in the same animals, activation of splenic T cells, measured as IFNγ production, was analyzed by ELISA after a 2-day stimulation with the CD8 epitope OVA(257–264). D, intratumor IFNγ levels in tumor homogenates from mice treated as previously were measured by ELISA. Data are representative of 1 of 2 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

produce proangiogenic factors VEGF and bFGF, suggesting that TGF β 1 may promote mechanisms that not only favor monocyte infiltration but also condition these cells toward a phenotype that facilitates melanoma progression. There are a number of publications indicating the relevant role of macrophage polarization from M₁ to M₂ in tumor progression (36, 37). According to this, our results support that monocytes could enhance tumor growth directly by the production of growth factors such as bFGF (38) and VEGF (39), and, indirectly, by their proangiogenic effect (13). This possibility seems to be in agreement with a previous work showing that MCP-1 blockage prevented angiogenesis and tumor growth in human malignant melanoma (40). Moreover, the induction of TGF β 1 mRNA in monocytes cultured with A375 melanoma conditioned medium might suggest that tumor-infiltrating monocytes could be a source of this cytokine in patients with melanoma. As it has been described in this work, this TGF β production may constitute a positive loop that further enhances tumor progression.

Consistent with the immunosuppressive effect of IL-10, we have shown that TGF β 1-MCM induced an IL-10-dependent functional impairment of dendritic cells, characterized by a lower production of proinflammatory factors TNF α and IL-12 and the upregulation of immunoregulatory molecules PDL-1 and COX-2. Moreover, we have also observed that TGF β 1-MCM induced other suppressive factors such as IDO in DCs, which may cause their impairment, although in this case, it was independent of the production of IL-10. As a result, a decreased ability to activate IFN γ -producing T lymphocytes was observed in DCs cultured with TGF β 1-MCM. Thus, these results show that in melanoma, TGF β 1 not only acts on DCs through the already described direct immunosuppressive mechanism (5) but also through indirect pathways mediated by IL-10 and other unknown factors which will enhance the final negative effect on this important cell population.

The multifaceted effect of TGF β 1 on tumor progression suggests that inhibition of this cytokine should be considered when planning therapeutic strategies in melanoma patients. Indeed, we have reported that inhibition of this cytokine in combination with immunotherapy had some beneficial effects

in a murine melanoma model (41). Because we found several mechanisms induced by TGF β 1 on A375 cells favoring tumor progression, we tested the effect of the TGF β 1 inhibitor peptide P144. *In vitro* assays showed that P144 inhibited TGF β 1-induced Smad3 phosphorylation and MCP-1 and IL-10 expression in A375 cells cultures. More important, *in vivo* administration of P144 in two melanoma models significantly delayed tumor growth. In athymic mice bearing A375 tumors, P144 treatment decreased macrophage infiltrate, intratumor MCP-1, and VEGF production as well as tumor angiogenesis, reinforcing the role of TGF β 1 and MCP-1 on this tumor growth mechanism. Moreover, in immunocompetent mice, P144 downregulated intratumor IL-10 expression, associated with stronger innate and adaptive immunity. These data show new roles of TGF β 1 in the progression of melanoma, such as those responsible for the induction of MCP-1 and IL-10. They suggest that its inhibition in combination with other therapies could be indicated in patients with metastatic melanoma in accordance with recently published data showing that inhibition of TGF β 1 enhances the efficacy of immunotherapy (42–44).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Edurne Elizalde, Uxue Latasa, Lucía Martínez, Virginia Belsúe, Verónica Fernández, and Laura Guembe for their excellent technical assistance with RT-PCR, Western blotting, and immunohistologic analysis, and Matías Avila and Juan José Lasarte for their interesting discussion.

Grant Support

This work was supported by "UTE project CIMA" to N. Díaz-Valdés, M. Basagoiti, I. Monreal, J.I. Riezu-Boj, F. Borrás-Cuesta, and P. Sarobe.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received July 23, 2010; revised November 4, 2010; accepted November 18, 2010; published OnlineFirst December 15, 2010.

References

- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29:117–29.
- Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:123–32.
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137–61.
- Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 1993;92:2569–76.
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:5262–70.
- Moretti S, Pinzi C, Berti E, Spallanzani A, Chiarugi A, Boddi V, et al. *In situ* expression of transforming growth factor beta is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and beta 3 integrin expression. *Melanoma Res* 1997;7:313–21.
- Shi Y, Hata A, Lo RS, Massague J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997;388:87–93.
- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807–21.
- Chiang AC, Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 2008;359:2814–23.
- Lopez-Bergami P, Ronai Z. Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1055–64.
- Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000;12:547–54.
- Nesbit M, Schaidt H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 2001; 166:6483–90.

13. Dirx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006;80:1183–96.
14. Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 1994;56:755–60.
15. Moretti S, Chiarugi A, Semplici F, Salvi A, De Giorgi V, Fabbri P, et al. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma Res* 2001;11:395–9.
16. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest* 2001;19:239–47.
17. Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortazar I, Bustos M, Penuelas I, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* 2003;22:12–20.
18. Echeverria I, Zabaleta A, Silva L, Diaz-Valdes N, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, et al. Monocyte-derived dendritic cells from HCV-infected patients transduced with an adenovirus expressing NS3 are functional when stimulated with the TLR3 ligand poly(I:C). *J Viral Hepat* 2008;15:782–9.
19. Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, et al. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:3662–6.
20. Loughlin PM, Cooke TG, George WD, Gray AJ, Stott DI, Going JJ. Quantifying tumour-infiltrating lymphocyte subsets: a practical immuno-histochemical method. *J Immunol Methods* 2007;321:32–40.
21. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, et al. CD4⁺/CD25⁺ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 2003;171:5931–9.
22. Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG. MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 2007;109:987–94.
23. Zhang F, Tsai S, Kato K, Yamanouchi D, Wang C, Rafii S, et al. Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009;284:17564–74.
24. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997;71:630–7.
25. Penafuerte C, Galipeau J. TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1197–206.
26. Sredni B, Weil M, Khomenok G, Leberthal I, Teitz S, Mardor Y, et al. Ammonium trichloro(dioxoethylene-O,O')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 auto-crine loop. *Cancer Res* 2004;64:1843–52.
27. Ilkovich D, Lopez DM. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol* 2008;17:977–85.
28. Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, et al. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 2007;127:2031–41.
29. Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol* 2000;142:125–31.
30. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577–84.
31. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005;118:3573–84.
32. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 2006;203:1651–6.
33. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
34. Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, et al. Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *J Invest Dermatol* 2004;123:1151–61.
35. DiSerio C, Doria L, Pellerito S, Prudovsky I, Micucci I, Massi D, et al. The release of fibroblast growth factor-1 from melanoma cells requires copper ions and is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt intracellular signaling pathway. *Cancer Lett* 2008;267:67–74.
36. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 2001;21:399–425.
37. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549–55.
38. Halaban R. Growth factors and tyrosine protein kinases in normal and malignant melanocytes. *Cancer Metastasis Rev* 1991;10:129–40.
39. Tao J, Tu YT, Li JW, Feng AP, Huan CZ, Wu Y, et al. Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell. *Clin Exp Dermatol* 2006;31:94–9.
40. Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, et al. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:279–84.
41. Llopiz D, Dotor J, Casares N, Bezunartea J, Diaz-Valdes N, Ruiz M, et al. Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int J Cancer* 2009;125:2614–23.
42. Kim S, Buchlis G, Fridlender ZG, Sun J, Kapoor V, Cheng G, et al. Systemic blockade of transforming growth factor-beta signaling augments the efficacy of immunogene therapy. *Cancer Res* 2008;68:10247–56.
43. Nam JS, Terabe M, Mamura M, Kang MJ, Chae H, Stuelten C, et al. An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res* 2008;68:3835–43.
44. Ueda R, Fujita M, Zhu X, Sasaki K, Kastenhuber ER, Kohanbash G, et al. Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin Cancer Res* 2009;15:6551–9.

Adjuvant Combination and Antigen Targeting as a Strategy to Induce Polyfunctional and High-Avidity T-Cell Responses against Poorly Immunogenic Tumors

Fernando Aranda, Diana Llopiz, Nancy Díaz-Valdés, José Ignacio Riezu-Boj, Jaione Bezunartea, Marta Ruiz, Marta Martínez, Maika Durantez, Cristina Mansilla, Jesús Prieto, Juan José Lasarte, Francisco Borrás-Cuesta, and Pablo Sarobe

Abstract

Low antigen expression and an absence of coimmunostimulatory signals may be partly responsible for the low immunogenicity of many tumors. It may be possible to overcome this situation by defining a combination of adjuvants and antigens that can activate a high-avidity antitumor response. Using the poorly immunogenic B16-OVA melanoma cells as tumor model, we tested different combinations of adjuvants and antigens to treat established tumors. In the absence of exogenous antigens, repeated administration of the TLR7 ligand Imiquimod together with anti-CD40 agonistic antibodies activated only innate immunity, which was insufficient to reject intradermal tumors. Administering this adjuvant combination together with OVA as a tumor antigen induced T-cell responses that delayed tumor growth. However, administering a combination of anti-CD40 plus TLR3 and TLR7 ligands, together with antigen targeting to dendritic cells through TLR4, was sufficient to induce tumor rejection in 50% of mice. This response was associated with a greater activation of innate immunity and induction of high-avidity polyfunctional CD8⁺ T-cell responses, which each contributed to tumor rejection. This therapy activated T-cell responses not only against OVA, which conferred protection against a rechallenge with B16-OVA cells, but also activated T-cell responses against other melanoma-associated antigens. Our findings support the concept that multiple adjuvant combination and antigen targeting may be a useful immunotherapeutic strategy against poorly immunogenic tumors. *Cancer Res*; 71(9); 3214–24. ©2011 AACR.

Introduction

Tumor immunotherapy is aimed at inducing immune responses to destroy tumor cells (1). However, tumors usually behave as poorly immunogenic for T cells, because as opposed to professional antigen presenting cells such as dendritic cells (DC), they express low levels of antigens, MHC, and costimulatory molecules (2). Moreover, unlike danger signals associated with pathogens, such as toll-like receptor (TLR) ligands, or inflammatory signals (cytokines or CD40L expressed on activated CD4 T cells), which induce DC maturation, tumor cells do not release immunogenic danger signals, unless they are submitted to radio- or chemotherapy (3). DC maturation, which involves upregulation of costimulatory, adhesion, and antigen-presenting molecules as well as the production of

cytokines and chemokines, is necessary for correct T-cell activation (4). Therefore, to overcome the low tumor immunogenicity, new therapeutic strategies are based on the use of adjuvants (molecules able to induce DC maturation) with or without exogenously added tumor antigens, which will activate DC to properly present tumor antigens to T cells and trigger their effector functions (5). With this aim, a great effort has been made to characterize DC-activating ligands to be used as adjuvant molecules, due to their immunostimulatory and/or targeting properties, and thus avoid the use of microorganisms containing undefined adjuvant mixtures (6). These activating molecules have been shown to increase the immunostimulatory properties of DC by signaling through different activation pathways, and in some cases, synergistic effects have been observed (7–11). Thus, development of therapeutic strategies based on the use of molecularly defined components is a main goal in tumor immunology.

We had previously shown that administration of an adjuvant mixture containing the TLR3 ligand poly(I:C) and agonistic anti-CD40 antibodies, together with ovalbumin (OVA) as tumor antigen, protected mice against the growth of E.G7-OVA thymoma and rejected established tumors in this model (12). B16 melanoma cell lines (13) are poorly immunogenic tumors which have many characteristics of tumors found in patients and consequently, may be a good model to develop immunotherapeutic strategies with potential clinical

Authors' Affiliation: Division of Hepatology and Gene Therapy, University of Navarra, Center for Applied Medical Research (CIMA), Pamplona, Spain

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Pablo Sarobe, University of Navarra, Center for Applied Medical Research (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Pío XII 55, 31008 Pamplona, Spain. Phone: +34-948-194700 ext. 3009; Fax: +34-948-194717; E-mail: psarobe@unav.es

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3259

©2011 American Association for Cancer Research.

applications. Several approaches have been used to induce immune responses able to reject B16 melanoma. They are based on the use of DC pulsed or expressing different types of antigens (14–16) or complex immunogens such as recombinant viruses, bacteria, or virus-like particles which contain many DC-activating signals (17–19). All these data prompted us to develop an immunotherapeutic strategy to treat B16-OVA established tumors using combinations of adjuvants and antigens. We report below the antitumor efficacy of this strategy, together with the immunological mechanisms responsible of its outcome.

Materials and Methods

Reagents

Peptides OVA(257–264) and TRP-2(180–188) were synthesized in an automatic APEX 396 multiple peptide synthesizer (Aapptec LLC). Peptide identity was confirmed by mass spectrometry and their purity was >95%, as determined by HPLC. OVA protein was purchased from Sigma Aldrich. Proteins containing the extra domain A from fibronectin EDA and EDA-OVA were produced as described (20). Endotoxin levels in these proteins were below 0.2 EU/μg protein as analyzed using the LAL test (Cambrex). Imiquimod was used *in vivo* as Aldara cream (Meda Pharma) and for *in vitro* experiments was obtained from Invivogen. Poly(I:C) was obtained from Amersham and agonistic anti-CD40 antibody was purified from FGK45.5 hybridoma cells as described (12).

Mice

Female C57BL/6 mice (6–8 weeks old; Harlan) were maintained in pathogen-free conditions and treated according to guidelines of our institution, after study approval by the review committee.

Cell lines

Parental EL-4 thymoma cells, OVA-transfected E.G7-OVA cells, and the NK-sensitive cell line YAC-1 were purchased from American Type Culture Collection and were grown as described (21). Cells were thawed and passaged according to ATCC guidelines for less than 6 months from the time they were received or thawed. ATCC authenticates cell lines by DNA fingerprinting by short tandem repeat analysis. B16-OVA (22) and B16.F10 tumor cells (13), obtained from Dr. G. Kroemer, were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum and antibiotics. No authentication was done, but the expression of OVA and TRP-2 antigens and MHC-I molecules was tested before the experiments by RT-PCT and flow cytometry, respectively.

Immunization of mice

Naïve mice received combinations of Imiquimod cream (topical application; 2.5 mg/mouse) plus subcutaneous administration of poly(I:C; 50 μg/mouse), anti-CD40 (50 μg/mouse), OVA protein (2–11 nmol/mouse), EDA (2 nmol/mouse), or EDA-OVA protein (2 nmol/mouse). Six days later, animals were killed and splenocytes were obtained for immunological analysis.

Tumor treatment experiments

Mice were injected intradermally with 10^5 tumor cells and when the tumor diameter reached 4 to 5 mm, treatment protocols containing combinations of the following adjuvants and antigens were applied in a 20-day protocol: Imiquimod cream was topically applied daily (2.5 mg/mouse) to shaved skin at the tumor site, whereas poly(I:C; 50 μg/mouse), anti-CD40 (50 μg/mouse), OVA protein (11 nmol/mouse) and EDA-OVA protein (2 nmol/mouse) were administered intratumor (i.t.) 3 times per week. Untreated mice challenged with tumor cells were used as positive controls of tumor growth. In some cases, tumor treatment was accompanied by administration of 200 μg of depleting anti-CD8, anti-NK1.1 or isotype control antibodies on days –1, 0, 2, 4 and 6, being 0 the day when treatment starts. Tumor volume was calculated according to the formula: $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Mice were killed when tumor diameter reached 17 mm.

Ex vivo analysis of DC

Mice bearing 4 to 5 mm tumors ($n = 5$) received a single administration of different adjuvant combinations as described earlier, and 1 day later tumors or tumor-draining lymph nodes were removed, pooled, and DC analyzed directly by flow cytometry or by real-time PCR after purification with anti-CD11c-conjugated magnetic beads (Miltenyi).

Analysis by real-time PCR

Total RNA extraction from tumor cell lines or dendritic cells and real-time PCR were performed as described (23), using primers shown in Supplementary Table S1. Results were normalized according to β-actin. The amount of each transcript was expressed by the formula: $2^{\Delta\text{Ct}}$ [$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\beta\text{-actin}) - \text{Ct}(\text{gene})$].

ELISPOT

Cells producing IFN-γ were enumerated by ELISPOT assays using a kit from BD-Biosciences as described (12). For T-cell responses, splenocytes were stimulated with peptides OVA (257–264; 1 μg/mL), TRP-2 (180–188; 10 μg/mL), OVA protein (10 μg/mL) or 4×10^4 irradiated (20,000 rads) tumor cells. When measuring NK-cell-derived production of IFN-γ, splenocytes were incubated with 4×10^4 mitomycin C-treated YAC-1 cells.

Flow cytometry

Expression of MHC K^b class I molecules in tumor cells was analyzed using anti-K^b-FITC labeled antibodies. To analyze NK cells and DC, spleens, tumor-draining lymph nodes or tumors were treated with collagenase and DNase for 15 minutes and homogenized. Then, cells were first incubated for 10 minutes with Fc Block (BD-Biosciences) and stained with specific antibodies. For NK cell analysis, cells were stained with anti-CD69-FITC, anti-CD3-PE and anti-NK1.1-APC-labeled antibodies. DC were analyzed using anti-CD11c-APC, anti-IA^b (either PE or FITC), anti-CD86-FITC, anti-CD80-FITC, and anti-CCR7-PE antibodies. To measure IL-12 production, DC were incubated for 5 hours with GolgiStop and after fixation and permeabilization were

labeled with anti-CD11c-APC, anti-IA^b-FITC, and anti-IL-12 p70-PE. OVA(257–264)/H-2K^b tetramer-specific T cells were enumerated as described (21), using a 1/1000 tetramer dilution. T-cell activation was analyzed after stimulation of splenocytes with 1 ng/mL of OVA(257–264) in the presence of GolgiStop and GolgiPlug (BD-Biosciences) with or without anti-CD107-FITC antibodies for 4 hours. Then cells were labeled with anti-CD8-APC and fixed, permeabilized, and stained with anti-IFN- γ -PE. For triple cytokine analysis, after surface staining with anti-CD8-FITC, cells were stained with anti-IFN- γ -PE, anti-TNF- α -PE-Cy7, and anti-IL-2-APC labeled antibodies. All antibodies were from BD-Biosciences, except anti-NK1.1 (e-Bioscience). Expression of the different markers was analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and Flowjo software (Tree Star, Inc.).

Measurement of cytokines by ELISA

IL-12 and TNF- α content in the serum obtained from the retroorbital plexus of mice, and IFN- γ from 48 hours culture supernatants of splenocytes stimulated with different concentrations of OVA(257–264) were measured using OptEIA Sets from BD-Biosciences.

Statistical analysis

Survival curves of animals treated with different protocols were plotted according to the Kaplan–Meier method and were compared using the log-rank test. Immune responses were analyzed using nonparametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests. *P* < 0.05 was taken to represent statistical significance.

Results

Immunotherapy based only on adjuvant administration has a poor effect on B16-OVA tumor-bearing mice, inducing innate but not adaptive immunity

We have previously reported that a single prophylactic administration of adjuvant molecules poly(I:C) and agonistic anti-CD40 antibodies plus OVA protein induced potent T-cell responses which protected 100% of mice from the growth of subcutaneous E.G7-OVA tumors (12). When this protocol was applied to the B16-OVA melanoma model, no differences in tumor growth and survival were observed between control and vaccinated mice (Supplementary Fig. S1A and B), demonstrating the poor immunogenicity and recognition of B16-OVA cells. Indeed, OVA expression of B16-OVA cells was very low, as compared with E.G7-OVA cells, and the same low expression was obtained for MHC class I K^b molecules (Supplementary Fig. S1C and D). This prompted us to adopt the poorly immunogenic B16-OVA tumor model to develop therapeutic strategies.

Because repeated intratumor administration of poly(I:C) and anti-CD40 rejected 35% of established E.G7-OVA tumors (12), we decided to test the therapeutic efficacy of repeated adjuvant administration on the B16-OVA tumor model. In these experiments, we combined topical application of Aldara cream (containing the TLR7 ligand Imiquimod) and intratumor injection of anti-CD40 antibodies. Mice bearing 7-day

intradermal tumors (5 mm) received repeated adjuvant administrations in a 20-day interval. As shown in Figure 1A, treated mice had a slight delay (*P* < 0.05) in tumor growth, but all mice died by day 40.

Rejection of E.G7-OVA tumors after administration of poly(I:C) plus anti-CD40 was associated with the induction of innate and adaptive immunity (12). Therefore, we studied these parameters when using Imiquimod and anti-CD40 as adjuvants. Naïve mice received a single administration of Imiquimod plus anti-CD40 and NK cell activity was studied by measuring CD69 upregulation on CD3⁺ NK1.1⁺ cells and IFN- γ production against the NK-sensitive YAC-1 cell line. A high activity in both functions was found at 24 hours (Fig. 1B). Regarding spleen DC, a clear upregulation of CD86 was observed (Fig. 1C). Finally, analysis of serum cytokines showed a peak for IL-12 at 6 hours (226 pg/mL), whereas TNF- α levels grew until 48 hours (625 pg/mL).

Analysis of antitumor adaptive immune responses was carried out in tumor-bearing mice, untreated or treated with Imiquimod plus anti-CD40. None of these groups displayed IFN- γ production against the CD8 T-cell epitope OVA(257–264) or OVA protein in ELISPOT assays (Fig. 1D). These results suggest that administration of adjuvants to B16-OVA tumor-bearing mice induces innate but not adaptive immunity.

Combination of adjuvants Imiquimod and anti-CD40 with the tumor antigen OVA induces adaptive immunity with better antitumor effects

The lack of adaptive immunity in B16-OVA-tumor bearing mice treated with adjuvants alone led us to hypothesize that inclusion of an antigen together with adjuvants might be able to induce T-cell responses. Indeed, repeated administration of OVA together with poly(I:C) and anti-CD40 enhanced E.G7-OVA tumor rejection from 35% to 100% (12). Immunization of naïve mice with OVA plus the adjuvant combination Imiquimod and anti-CD40 had a strong effect on the induction of T-cell responses (Fig. 2A), similar to responses observed when combining OVA plus poly(I:C) and anti-CD40 (12). We thus treated tumor-bearing mice with OVA plus Imiquimod and anti-CD40 3 times per week during a 20-day period. In this case, tumor volume was kept below 0.5 cm³ during the treatment period, as compared to untreated animals, which at day 20 had a mean tumor volume above 1 cm³ (*P* < 0.05; Fig. 2B). Moreover, only 33% of untreated mice were alive at the end of treatment (day 20), whereas 100% of treated mice survived (*P* < 0.05; Fig. 2C). Also, as opposed to mice treated only with adjuvants (Fig. 1A), once treatment finished, animals treated with OVA plus Imiquimod and anti-CD40 had slow-growing tumors until day 30, when they started to grow and finally all mice died at day 40. We also analyzed the antitumor effect of OVA plus the combination of poly(I:C) and anti-CD40, a similar T-cell activation strategy (12) which induced rejection of E.G7-OVA tumors. Equivalent results were obtained in these experiments, with a significant delay in tumor growth (*P* < 0.01), but without tumor rejection (Supplementary Fig. S2).

The lack of tumor rejection in treated animals could not be attributed to the absence of T-cell responses, because

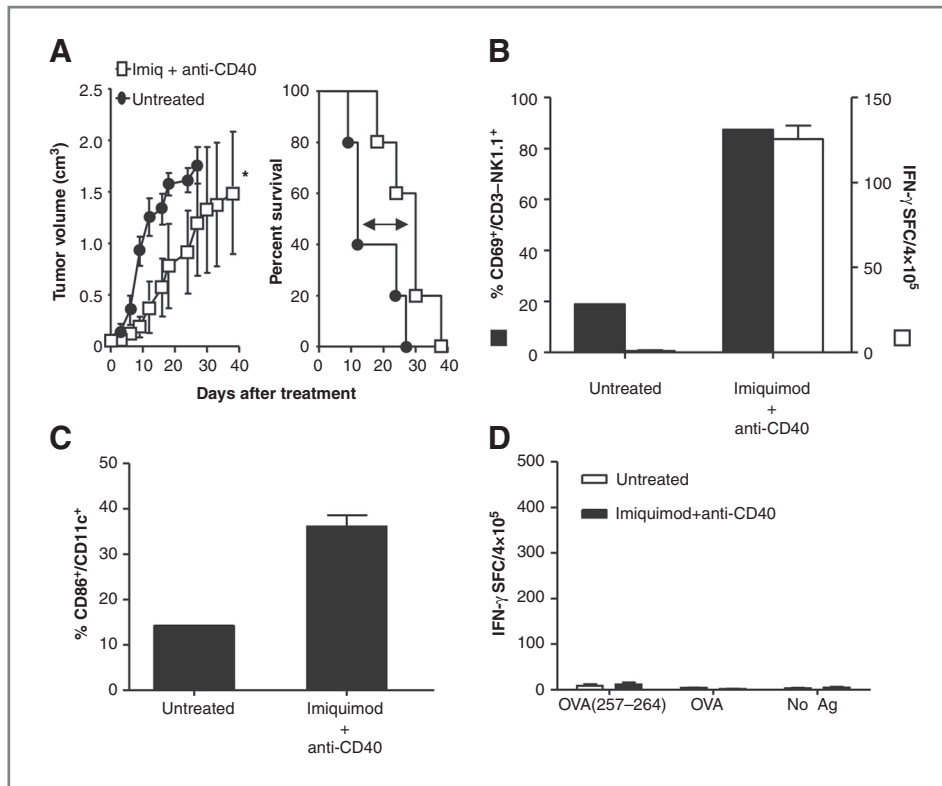


Figure 1. Immunotherapy based only on adjuvant administration has a poor effect of B16-OVA tumor-bearing mice. A, C57BL/6 mice ($n = 6$) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated 3 times per week during a 20-day period with Imiquimod + anti-CD40 or left untreated. Graph represents average tumor volume per group of animals studied and survival (*, $P < 0.05$, untreated vs. Imiquimod + anti-CD40). B, naïve mice ($n = 3$) were injected with Imiquimod plus anti-CD40 and NK-cell activation was measured 1 day later in the spleen as CD69 upregulation in CD3⁺-NK1.1⁺ cells (filled bars) and as IFN- γ production against the NK-cell-sensitive YAC-1 cell line (open bars). C, activation of splenic DC in animals shown in B was measured as % of CD86⁺ cells in the CD11c⁺ population. D, mice ($n = 3$) with 7-day tumors were treated twice 2 days apart with Imiquimod plus anti-CD40 or left untreated and 1 week after first treatment recognition of peptide OVA(257-264) and OVA protein by splenocytes was measured by ELISPOT. Results are representative of 2 independent experiments.

tumor-bearing mice treated with as few as 2 immunizations showed clear responses against tumor antigens (a representative example of mice treated with OVA plus Imiquimod and anti-CD40 is shown in Fig. 2D). Thus, a protocol which combines the tumor antigen with double-adjuvant mixtures induces T-cell responses, delays tumor growth during treatment period and some days beyond, but does not lead to tumor rejection.

Multiple adjuvant combination and antigen targeting enhances innate immunity

The poor but significant effect that antigen plus adjuvant administration had on tumor growth suggested that new strategies inducing enhanced T-cell responses might be more suitable to attain tumor rejection. Thus, looking for a higher synergistic effect between adjuvants, all 3 molecules (anti-CD40, poly(I:C) and Imiquimod) were included in a multiple adjuvant combination (MAC). Moreover, to enhance not only innate immunity, but also to target antigen to antigen presenting cells, OVA was coupled to the extra domain A of fibronectin (EDA), a TLR4 ligand which enhances innate and adaptive immunity, and when coupled to antigens, targets them to TLR4-expressing antigen presenting cells (20). Con-

cerning the activation of innate immunity, in vitro experiments using bone marrow-derived DC from naïve mice stimulated with the different combinations showed that MAC + EDA induced the highest levels of mRNA corresponding to costimulatory molecules associated with T-cell activation and cytokines important for induction of CD8 T-cells (Supplementary Fig. S3). Most importantly, ex vivo analysis of tumor-draining lymph node DC from mice treated with different combinations showed that MAC or EDA+MAC induced the highest CD80 and CD86 expression levels, as occurred with IL-12 and the chemokine receptor CCR7, in accordance with the higher numbers of DC found (Fig. 3A). Equivalent results were obtained analyzing mRNA of costimulatory molecules, IL-15 and IL-15R ($P < 0.05$; MAC or EDA + MAC vs. remaining groups; Fig. 3B). Administration of EDA without additional adjuvants had a negligible effect on these parameters. No clear differences were observed when analyzing tumor DC (data not shown), probably due to migration of activated DC to draining lymph nodes.

Ex vivo analysis of NK cell activation, after a single administration of adjuvant combinations to naïve mice showed that, EDA-OVA + MAC induced the strongest NK-cell derived IFN- γ production of the 4 combinations tested (Supplementary Fig. S3;

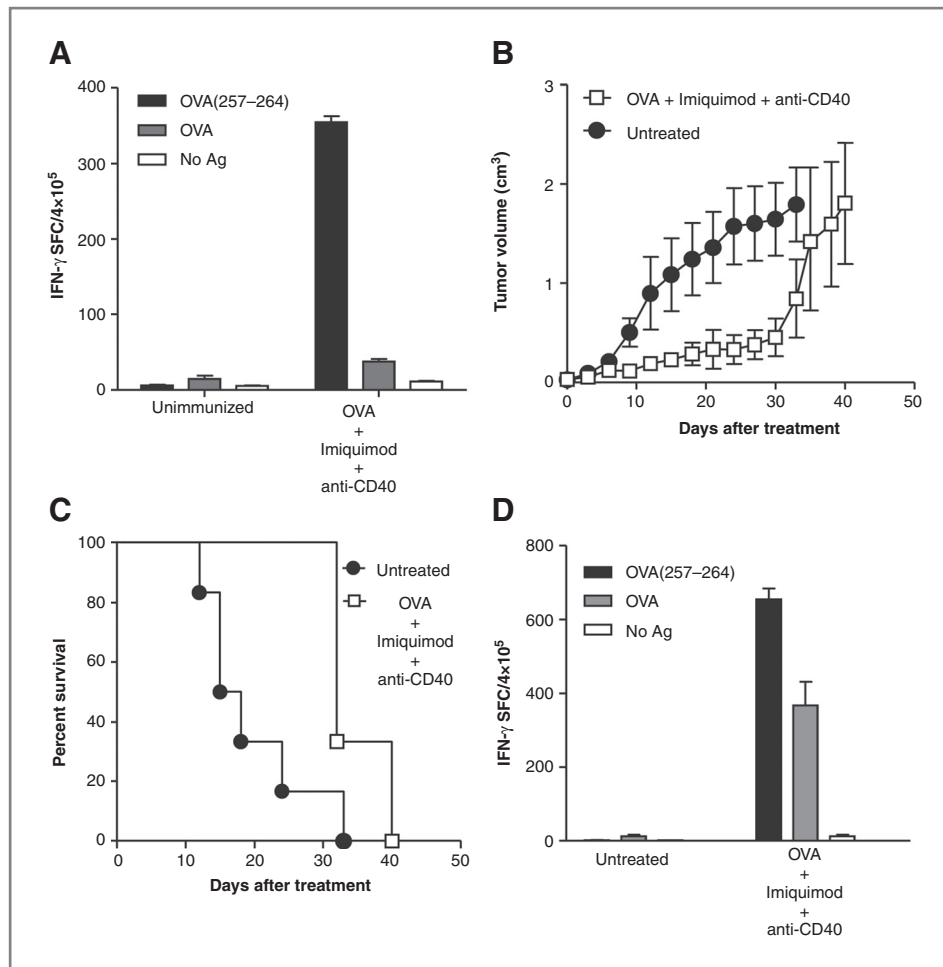


Figure 2. Combination of adjuvants Imiquimod + anti-CD40 with the tumor antigen OVA induces adaptive immunity with better antitumor effects. A, C57BL/6 mice ($n = 3$) received a single immunization with OVA + Imiquimod + anti-CD40 or were left untreated. Six days later, they were killed and the number of IFN- γ -producing cells after stimulation with OVA antigens was measured by ELISPOT. C57BL/6 mice ($n = 6$) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated 3 times per week during a 20-day period with OVA + Imiquimod + anti-CD40. Average tumor volume per group of animals studied (B) and survival (C) are represented. Mice ($n = 2$) bearing 5 mm tumors received 2 administrations of OVA + Imiquimod + anti-CD40 and 6 days after the first injection their splenocytes were stimulated with OVA antigens and IFN- γ -producing cells were measured by ELISPOT (D). Results are representative of 2 independent experiments.

$P < 0.01$; EDA-OVA + MAC vs. EDA-OVA + Imiquimod + anti-CD40, or OVA + MAC vs. OVA + Imiquimod + anti-CD40). When adjuvants were administered to tumor-bearing mice, MAC and EDA + MAC were the most potent combinations ($P < 0.05$; MAC or EDA + MAC vs. remaining groups; Fig. 3C).

Multiple adjuvant combination and antigen targeting induces polyfunctional high avidity T-cell responses

Analysis of adaptive immunity in naïve mice immunized with the different combinations was done by ELISPOT assays which measured the number of CD8 and CD4 T-cells producing IFN- γ against OVA(257-264) peptide and OVA protein, respectively. EDA-OVA + MAC showed a synergistic effect, as compared with immunization with OVA plus triple or double adjuvant combinations (Fig. 4A; $P < 0.01$; EDA-OVA + MAC vs. remaining groups). Antigen coupling to EDA was necessary to obtain these high responses, because immunization with MAC plus EDA and free OVA induced lower responses, mainly for those mediated by CD8 T cells (Supplementary Fig. S4).

Besides quantitative parameters of T-cell activation, the quality of the CD8 T-cell responses was studied by stimulating splenocytes with decreasing OVA(257-264) concentrations.

Interestingly, splenocytes from mice immunized with EDA-OVA + MAC and stimulated with concentrations as low as 0.1 to 1 ng/mL of OVA(257-264) still produced high amounts of IFN- γ (Fig. 4B), as compared to the other groups. These higher IFN- γ levels were due not only to an expansion of high-avidity OVA(257-264)-specific T-cells, as found by staining with low OVA(257-264)/K^b tetramer concentrations, but also to enhanced activation of IFN- γ -producing cells, as demonstrated in ELISPOT assays using 0.1 ng/mL of peptide (Fig. 4C). Finally, other qualitative aspects were analyzed at the single cell level by studying polyfunctional CD8 T-cells (cells producing several cytokines and displaying different effector functions). These analyses were carried out on high-avidity T cells, by stimulating splenocytes with 1 ng/mL of OVA(257-264). First, a higher number of CD8 T cells with lytic activity against OVA(257-264), determined by the expression of CD107, was found in splenocytes from mice immunized with EDA-OVA + MAC; and second, these animals had the highest percentage of CD8 T cells simultaneously producing IFN- γ , TNF- α , and IL-2 (Fig. 4D). These results suggest that immunization with EDA-OVA + MAC induces stronger responses with a higher avidity for the antigen, which are able to display several effector functions.

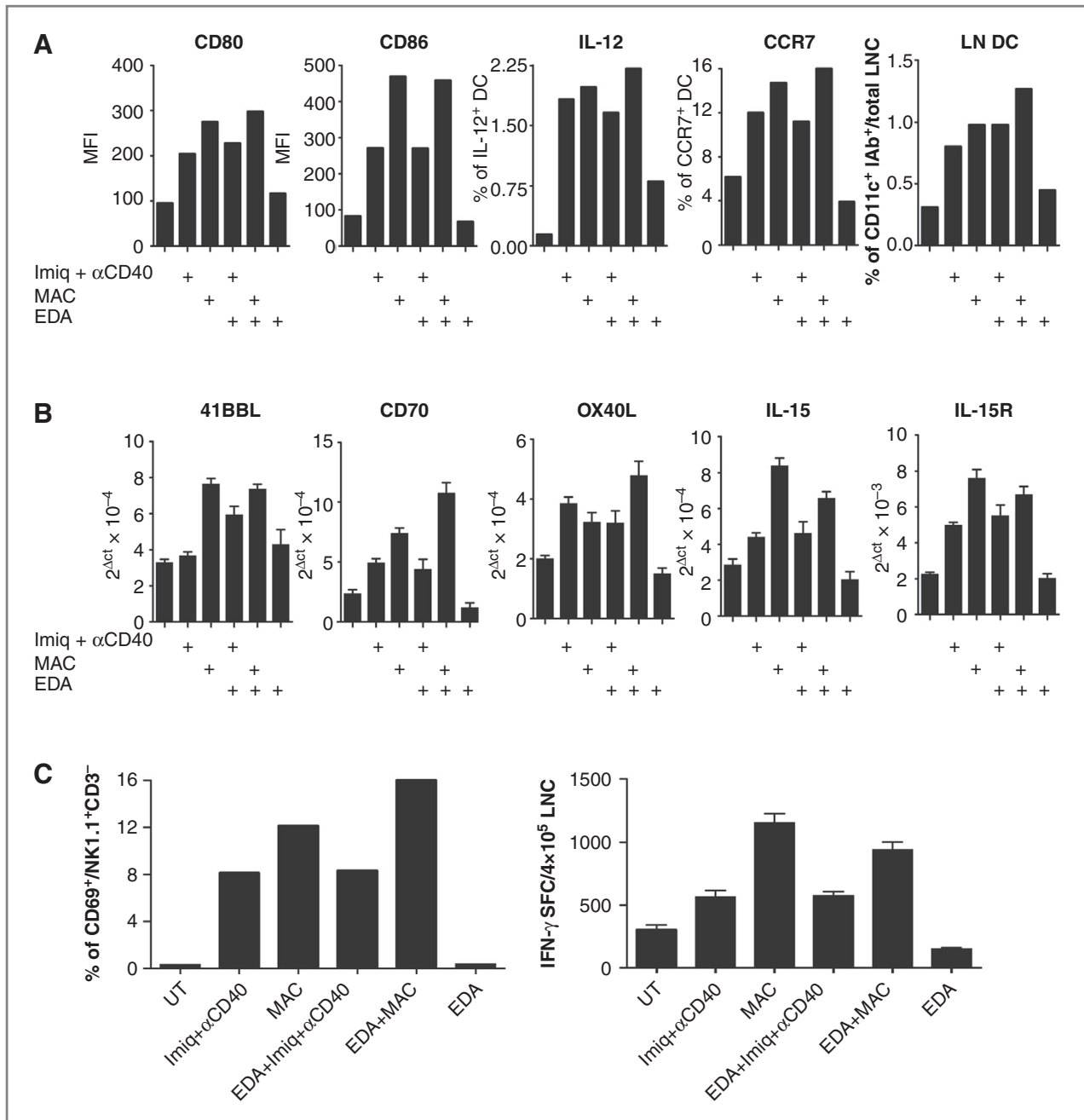


Figure 3. *In vivo* activation of innate immunity by a multiple adjuvant combination. C57BL/6 mice ($n = 5/\text{group}$) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated with different adjuvant combinations. One day later, tumor-draining lymph nodes were removed and pooled. A, expression of CD80, CD86, CCR7, IL-12 p70 molecules in the DC population, defined as CD11c⁺IAb⁺, as well as the number of DC, were measured by flow cytometry. B, expression of mRNA of costimulatory molecules, IL-15 and IL-15R were measured by real-time PCR in DC ($n = 5$ wells/group) purified with magnetic beads. C, NK cells were analyzed as the percentage of activated NK cells (CD69⁺ in NK1.1⁺CD3⁻ cells) and by IFN- γ production against the NK-sensitive cell line YAC-1 in ELISPOT ($n = 5$ wells/group). Results correspond to 1 of 2 independent experiments.

With these results, we measured immune responses against tumor cells in tumor-bearing mice treated during 10 days with the different combinations. Mice treated with EDA-OVA + MAC had the lowest tumor size at day 10 and the highest proportion of tumor-free mice (Supplementary Fig. S5), in agreement with the ability of their splenocytes to recognize *in*

vitro B16-OVA tumor cells (Fig. 4D), as well as B16.F10 cells. By contrast, a lower or nil recognition by splenocytes from remaining groups was observed. No differences in OVA expression were observed in tumors belonging to groups treated with different adjuvant combinations (Supplementary Fig. S5).

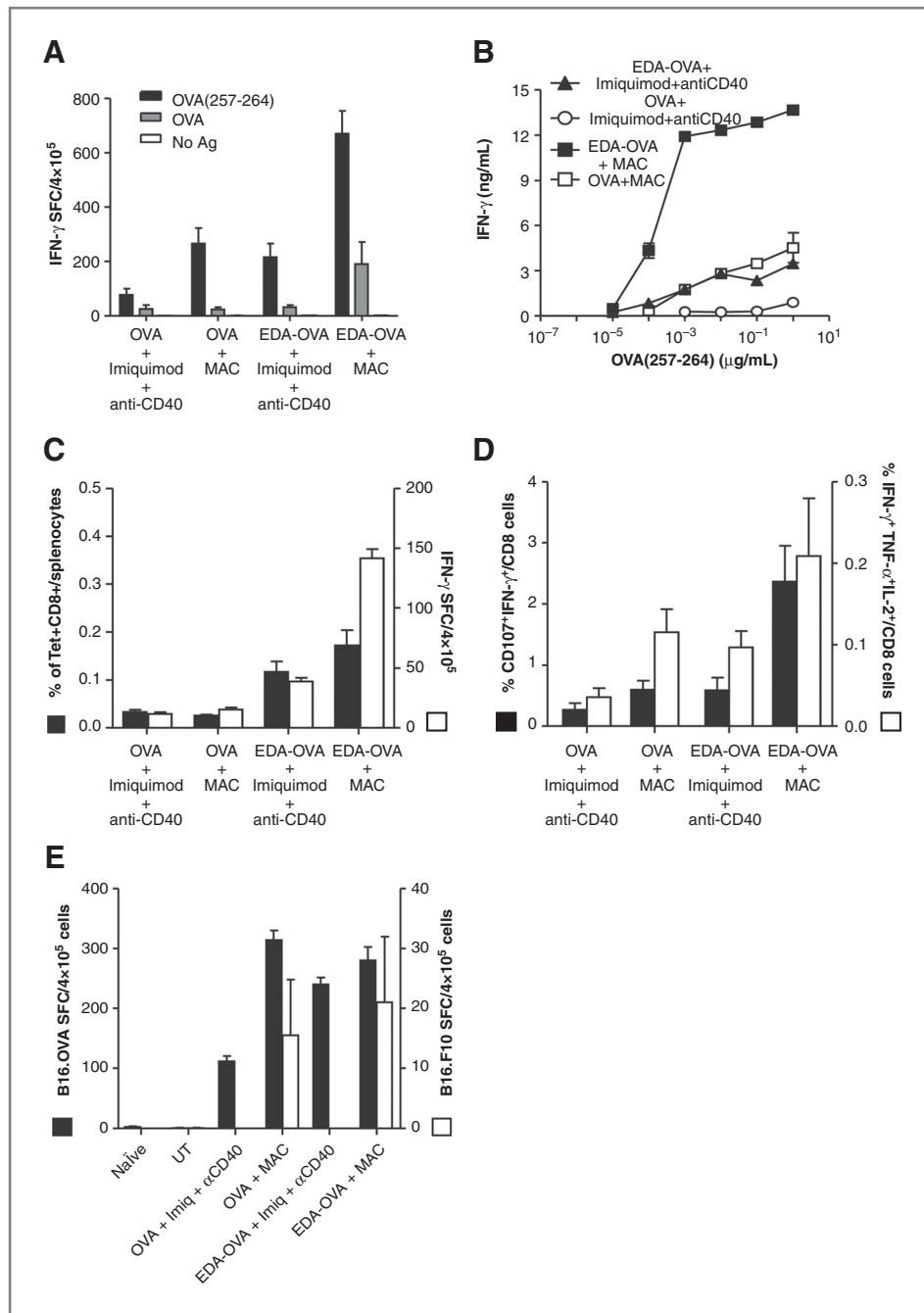


Figure 4. A multiple adjuvant combination plus antigen-targeting strategy induces polyfunctional high-avidity T-cell responses. A, C57BL/6 mice ($n = 3-4$) received a single immunization with OVA plus different adjuvant combinations and 6 days later the number of IFN- γ -producing cells was measured by ELISPOT after stimulation with OVA antigens. B, IFN- γ content, as determined by ELISA, of cell culture supernatants of splenocytes obtained from groups shown in A and stimulated with different concentrations of OVA(257-264). C, percentage of high-avidity OVA(257-264) K^b tetramer $^+$ CD8 $^+$ cells/total splenocytes (1/1000 tetramer dilution) and number of IFN- γ SFC (stimulation with 0.1 ng/mL) in splenocytes from mice immunized as earlier. D, percentage of CD107 $^+$ IFN- γ^+ and IFN- γ^+ TNF- α^+ IL-2 $^+$ CD8 cells in splenocytes from mice immunized as earlier after stimulation with 1 ng/mL of OVA(257-264). E, splenocytes obtained from naive mice, B16-OVA-tumor-bearing mice untreated (UT) or treated for 2 weeks with different adjuvant combinations ($n = 6$ /group) were stimulated *in vitro* with irradiated B16-OVA or B16.F10 cells and the number of IFN- γ -producing cells was measured by ELISPOT. Results are representative of 2 to 3 independent experiments.

EDA-OVA + MAC administration induces B16-OVA tumor rejection mediated by CD8 $^+$ cells

EDA-OVA + MAC, characterized as the best combination to induce innate and adaptive immune responses, was used to treat B16-OVA tumor-bearing mice in long-term experiments. In mice treated with this strategy, tumor growth was completely blocked until day 30, whereas all untreated mice had already died by day 28. Moreover, beyond this day, tumor growth rate was slower in the treated group, and half of mice rejected their tumor and still survived at day 80 ($P < 0.001$; EDA-OVA + MAC vs. UT; Fig. 5A and B).

Administration of EDA-OVA + MAC s.c. at a distal site almost blocked tumor growth for 2 weeks, but as opposed to intratumor administration, all tumors grew after treatment, suggesting that local administration was required to maintain the beneficial effect (Supplementary Fig. S6).

The relevance of effector populations on tumor rejection induced by EDA-OVA + MAC administration was studied by depleting CD8 and NK cells in tumor-bearing mice before treatment. These experiments (Fig. 5D) showed that CD8 depletion abrogated most of the beneficial effect provided by EDA-OVA + MAC ($P < 0.01$; CD8-depleted vs. Isotype, in

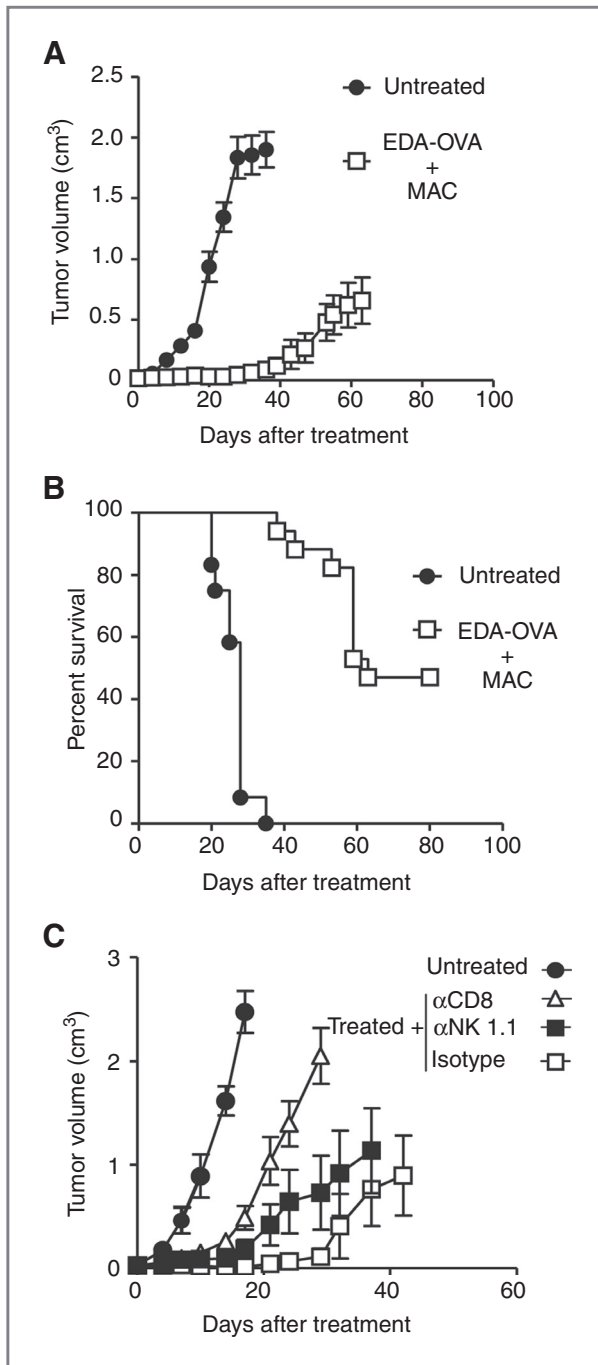


Figure 5. Therapeutic administration of EDA-OVA+MAC induces tumor rejection mediated by CD8⁺ cells. C57BL/6 mice (14–17 per group) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated during a 20-day period with EDA-OVA+MAC or left untreated. Tumor volume (A) and mice survival (B) was monitored twice a week. Results correspond to the sum of 2 independent experiments. C, C57BL/6 mice (7–9 per group) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were depleted of CD8 cells, NK cells, or administered control antibodies previously to treatment with EDA-OVA+MAC as earlier. Undepleted untreated mice were used as control, and tumor growth was measured in all groups.

survival). Depletion of NK cells had only an initial minor effect on tumor growth, in agreement with a decrease of 15% to 20% in the induction of CD8 responses when using mice depleted of NK cells (Supplementary Fig. S7), but no differences were finally observed in survival ($P = 0.77$; NK-depleted vs. Isotype). These results suggest that CD8 cells are the main effector population responsible for tumor rejection.

Administration of EDA-OVA+MAC to tumor-bearing mice induces T-cell responses against different tumor antigens

To analyze the role of the different tumor antigens recognized by T-cells, at day 80 (60 days after finishing treatment), re-challenge experiments were carried out in surviving animals. None of cured animals after treatment with EDA-OVA + MAC developed tumors when re-challenged with B16-OVA cells, whereas a quick tumor growth was observed in control untreated mice. Moreover, when equivalent mice cured after treatment with EDA-OVA + MAC were re-challenged with B16.F10 tumor cells, which do not express OVA, 80% of mice remained tumor free (Fig. 6A). Study of responses against tumor antigens expressed by B16-OVA tumor cells in cured mice showed that they not only recognized OVA, but also the melanoma antigen TRP-2 (Fig. 6B), suggesting that this treatment not only induces responses against the administered antigen, but also against other antigens expressed by tumor cells. Indeed, in agreement with results shown in Figure 5, as early as 10 days after starting treatment, responses against TRP-2(180–188) peptide were observed in mice receiving EDA-OVA + MAC or OVA + MAC (Fig. 6C). This prompted us to see the efficacy of a new therapy based on administration of MAC plus EDA fused to fragment 59–257 of TRP-2 (EDA-TRP2), a protein that activates innate and adaptive immunity (Supplementary Fig. S8). As shown in Figure 6D, all untreated animals died by day 13, whereas 30% of mice treated with EDA-TRP2 + MAC still survived at day 40 ($P < 0.001$; EDA-TRP2 + MAC vs. UT).

Discussion

The failure of many preclinical immunotherapeutic strategies when applied to patients is partially related to the poor immunogenicity of human tumors, as opposed to malignant cells used in animal models that are usually more immunogenic. Thus, protection or tumor rejection could not be achieved in the B16-OVA tumor model using a mixture containing OVA plus poly(I:C) and anti-CD40, a successful protocol used in the E.G7-OVA model. Indeed, B16-OVA cells express much lower levels of OVA antigen and MHC molecules, as compared to E.G7-OVA cells, which would impair tumor recognition and rejection by antigen-specific T cells. Thus, using this poorly immunogenic model, we have analyzed the efficacy of different immunotherapeutic strategies based on the use of different adjuvant combinations, with or without tumor antigens. As opposed to the E.G7-OVA, B16-OVA tumors are not rejected after repeated administration of different double-adjuvant combinations. Adjuvant administration in the former model induces both innate and adaptive

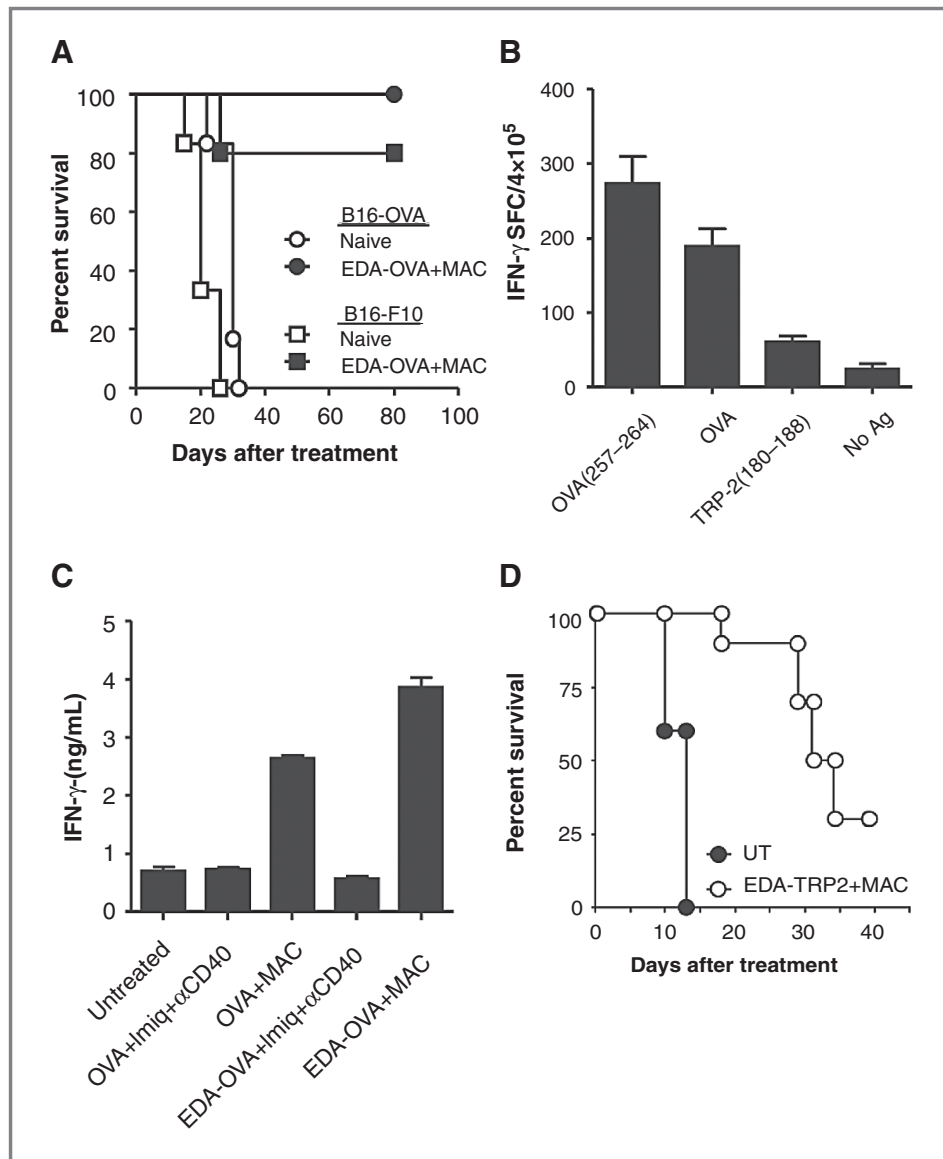


Figure 6. Administration of EDA-OVA+MAC to tumor-bearing mice induces T-cell responses against different tumor antigens. A, mice ($n = 5-6$ per group) that rejected B16-OVA tumors after immunotherapy with EDA-OVA+MAC or naïve mice were challenged with 10^5 B16-OVA or B16.F10 tumor cells 60 days after completing the treatment and survival was monitored twice a week. B, immune responses against tumor antigens were measured by IFN- γ ELISPOT in mice cured after immunotherapy with EDA-OVA+MAC. C, immune responses against TRP-2(180-188) peptide were measured in B16-OVA tumor-bearing mice treated for 10 days with different adjuvant combinations. D, C57BL/6 mice (10 per group) were injected s.c. with 10^5 B16.F10 tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated during a 20-day period with EDA-TRP2+MAC or left untreated. Mice survival was monitored twice a week.

immunity, whereas in the latter, only innate immune responses can be detected. The low levels of tumor antigen expressed and/or released by B16-OVA cells which are available for presentation to T cells after activation of innate immune cells, probably account for the lack of induction of T-cell responses. This hypothesis is reinforced by the finding that tumor growth is slower only during the treatment period, probably due to innate immunity primed by adjuvants, and increases after treatment.

Inclusion of the antigen OVA with Imiquimod and anti-CD40, or with poly(I:C) and anti-CD40, induced T-cell responses in naïve and tumor-bearing mice, and tumor growth was delayed several days beyond the end of treatment, suggesting that the induction of T-cell responses has additional but not sufficient antitumor effect. To overcome the poor efficacy of these protocols, we used a multiple adjuvant

combination containing Imiquimod, poly(I:C), anti-CD40 as well as EDA coupled to OVA, which acts as adjuvant through TLR4 and targets the antigen to antigen presenting cells. In this case, tumor rejection was observed in half of treated animals, associated with a clear improvement of the immune response induced by treatment. A synergy between different adjuvants has been reported *in vitro* and *in vivo* for DC (7, 8, 10, 11, 24), mainly for those receptors which do not share signaling pathways. Thus, we used poly(I:C), which binds to TLR3 (25) and triggers the TRIF pathway, Imiquimod, which uses TLR7 with Myd88 as adaptor molecule (26), anti-CD40, which triggers a TRAF-dependent pathway (27), and EDA, able to bind to TLR4, a receptor connected to the TRIF and Myd88 pathways (28). Although EDA+MAC induced the highest upregulation of costimulatory molecules as well as cytokines associated with T-cell activation on DC *in vitro*, both MAC and

EDA+MAC induced the highest DC activation *in vivo* in tumor-bearing mice. Moreover, enhancing effects were observed not only on antigen-presenting cells, which concomitantly affect T-cell responses, but also on NK cells, which in turn may also help the induction of Th1 T-cell responses. Indeed, when using this adjuvant combination, NK cells are partially responsible for the induction of IFN- γ -producing CD8 T cells. The lack of tumor rejection in mice treated at a distal site suggests that local effect of adjuvants is necessary for tumor rejection, because it may activate innate immunity with direct inflammatory and antitumor effects which also collaborate by triggering adaptive immunity.

Regarding adaptive immunity, although MAC induced similar innate immunity *in vivo*, EDA-OVA + MAC activated stronger T-cell responses, probably due to the targeting effect of EDA. Moreover, EDA-OVA + MAC also induced qualitatively better responses, related to antigen avidity and polyfunctional T cells. Concerning avidity of CD8 T cells, which has been related to the efficacy of antiviral (29, 30) and antitumor immunity (31, 32), it was found that CD8 T cells primed by EDA-OVA+MAC strongly recognized OVA(257–264) peptide at low antigen concentrations. The high IFN- γ production induced by these low antigen concentrations (a situation similar to that found in poorly immunogenic tumors) probably helps upregulating MHC molecules on tumor cells, and concomitantly in their recognition by T cells. Indeed, EDA-OVA+MAC induced T cells that efficiently recognized B16-OVA tumors *in vitro*, and is probably responsible for its antitumor efficacy *in vivo*. In line with this result, it has been recently published that an adjuvant combination containing ligands of TLR2/6, TLR3 and TLR9 qualitatively enhanced T-cell responses, by increasing their functional avidity in a viral protection model (33). Interestingly, that triple combination, which only shares with EDA + MAC the TLR3 ligand poly(I:C), also increased IL-15 and IL-15R expression, a cytokine which mediates CD8 T-cell avidity maturation (34), suggesting that induction of this cytokine by adjuvant combinations might be related to their ability to activate high-avidity T cells. Finally, activation of polyfunctional CD8 T cells, those producing several cytokines and displaying different effector functions, was higher in response to low antigen concentrations after EDA-OVA + MAC administration. Polyfunctional T

cells produce more cytokine per cell (35, 36) and they are associated with control of viral infections (37, 38) and tumor regression (39). Thus, parameters associated with better T-cell responses such as higher IFN- γ production, induction of high-avidity T cells which recognize lower antigen levels expressed by poorly immunogenic tumor cells, or induction of polyfunctional T cells, may explain the higher efficacy of this strategy.

Rechallenge experiments using cured mice have shown that they are not only completely protected against the same tumor, but also show partial protection against a tumor lacking the antigen used in the therapeutic adjuvant combination, suggesting that epitope spreading takes place during therapy-mediated tumor rejection. Immunity against tumor antigens not used in immunization (mainly TRP-2) was induced when administering EDA-OVA + MAC, making these tumor antigens immunogenic, which in the absence of activating signals, did not trigger T-cell responses. Thus, this strategy has the advantage of inducing additional protective immunity against other unknown tumor antigens not used in the therapy.

In summary, a poorly immunogenic tumor not responding to therapies based on single or double adjuvant administration can be made to respond using a multiple adjuvant combination and tumor antigen targeting strategy, associated with the induction of quantitatively and qualitatively better T-cell responses.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank Dr. G. Kroemer for his kind gift of cell lines.

Grant Support

This work was supported by "UTE project CIMA", by Fundación Barrié de la Maza and by Condesa de Fenosa to all authors and by SAF2010-15074 to P. Sarobe and SAF2010-15060 to J.J. Lasarte.

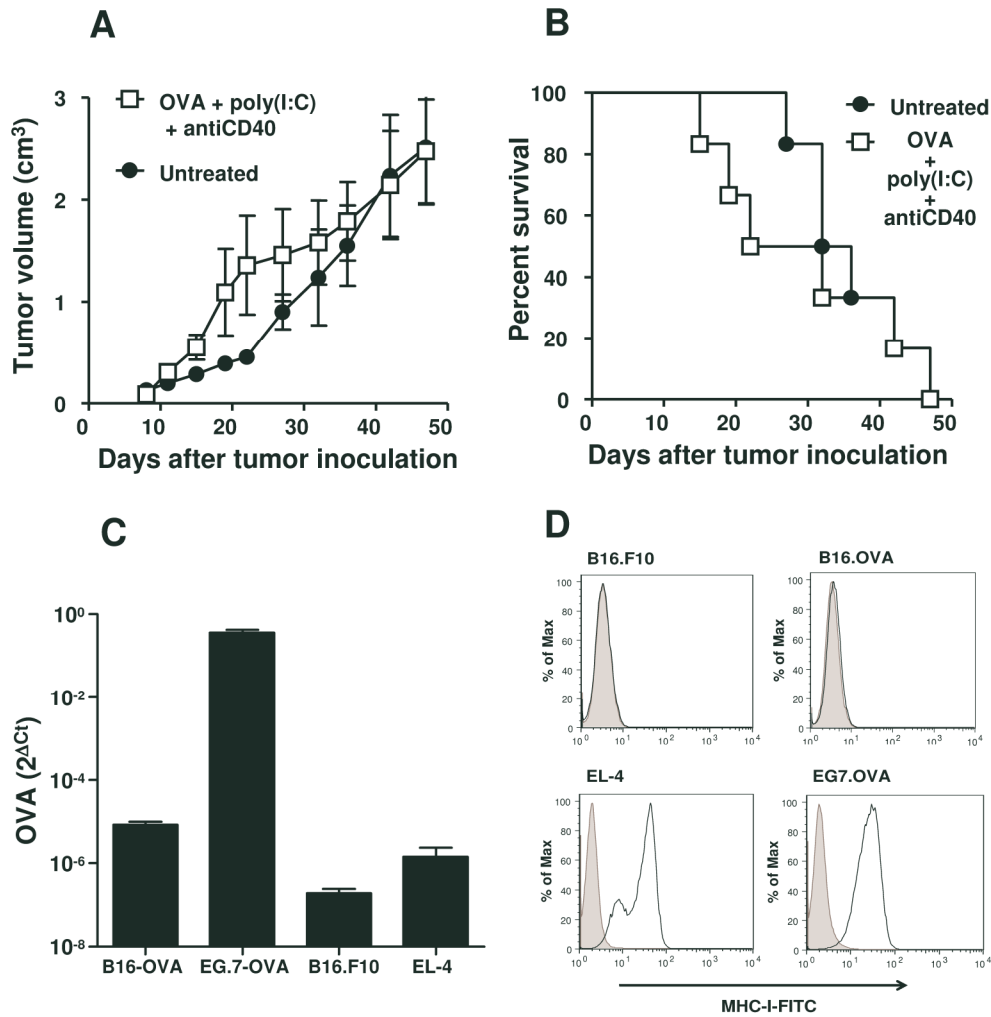
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 3, 2010; revised February 22, 2011; accepted February 27, 2011; published OnlineFirst March 14, 2011.

References

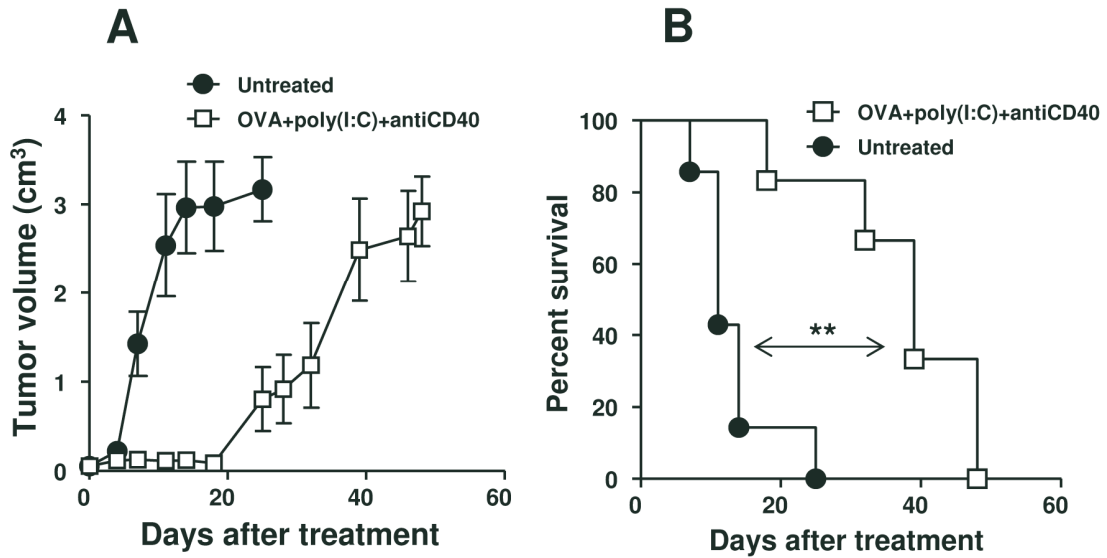
1. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008;358:2704–15.
2. Smith ME, Marsh SG, Bodmer JG, Gelsthorpe K, Bodmer WF. Loss of HLA-A,B,C allele products and lymphocyte function-associated antigen 3 in colorectal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5557–61.
3. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 2008;20:504–11.
4. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
5. Celis E. Toll-like receptor ligands energize peptide vaccines through multiple paths. *Cancer Res* 2007;67:7945–7.
6. Cho HI, Celis E. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects. *Cancer Res* 2009;69:9012–9.
7. Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM, Riter TR, Wade WF, Barth RJ, et al. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med* 2004;199:775–84. Epub 2004 Mar 8.
8. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:769–76.
9. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses *in vivo*. *Blood* 2006;108:544–50.
10. Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T, Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:1045–51.

11. Zhu Q, Egelston C, Vivekanandhan A, Uematsu S, Akira S, Klinman DM, et al. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16260–5.
12. Llopiz D, Dotor J, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, et al. Combined immunization with adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:19–29.
13. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 1975;35:218–24.
14. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996;184:465–72.
15. Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997;186:1177–82.
16. Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, Crosti MC, Ronchetti A, Moro M, et al. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 2000;165:2651–6.
17. Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sata S, Nagata-Takeshita H, et al. Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN- β gene. *J Immunol* 2006;177:3564–76.
18. Krishnan L, Sad S, Patel GB, Sprott GD. Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer Res* 2003;63:2526–34.
19. Brinkman M, Walter J, Grein S, Thies MJ, Schulz TW, Herrmann M, et al. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:611–22.
20. Lasarte JJ, Casares N, Gorraiz M, Hervás-Stubbs S, Arrillaga L, Mansilla C, et al. The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. *J Immunol* 2007;178:748–56.
21. Llopiz D, Dotor J, Casares N, Bezunartea J, Díaz-Valdés N, Ruiz M, et al. Peptide inhibitors of transforming growth factor- β enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int J Cancer* 2009;125:2614–23.
22. Brown DM, Fisher TL, Wei C, Frelinger JG, Lord EM. Tumours can act as adjuvants for humoral immunity. *Immunology* 2001;102:486–97.
23. Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, et al. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:3662–6.
24. Scarlett UK, Cubillos-Ruiz JR, Nesbeth YC, Martinez DG, Engle X, Gewirtz AT, et al. In situ stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancer-infiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells. *Cancer Res* 2009;69:7329–37.
25. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732–8.
26. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196–200.
27. Vidalain PO, Azocar O, Servedi-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Manie S. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *Embo J* 2000;19:3304–13.
28. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640–3.
29. Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4102–7.
30. Gallimore A, Dumrese T, Hengartner H, Zinkernagel RM, Rammensee HG. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J Exp Med* 1998;187:1647–57.
31. Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, Greenberg PD. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol* 1999;162:2227–34.
32. Zeh HJ 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* 1999;162:989–94.
33. Zhu Q, Egelston C, Gagnon S, Sui Y, Belyakov IM, Klinman DM, et al. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:607–16.
34. Oh S, Perera LP, Burke DS, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15/IL-15R α -mediated avidity maturation of memory CD8 $^{+}$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15154–9.
35. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 2007;13:843–50.
36. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 2007;81:8468–76.
37. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8 $^{+}$ T cells. *Blood* 2006;107:4781–9.
38. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 2004;103:966–72.
39. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Shiku H. Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8 $^{+}$ T cells. *Eur J Immunol* 2009;39:241–53.



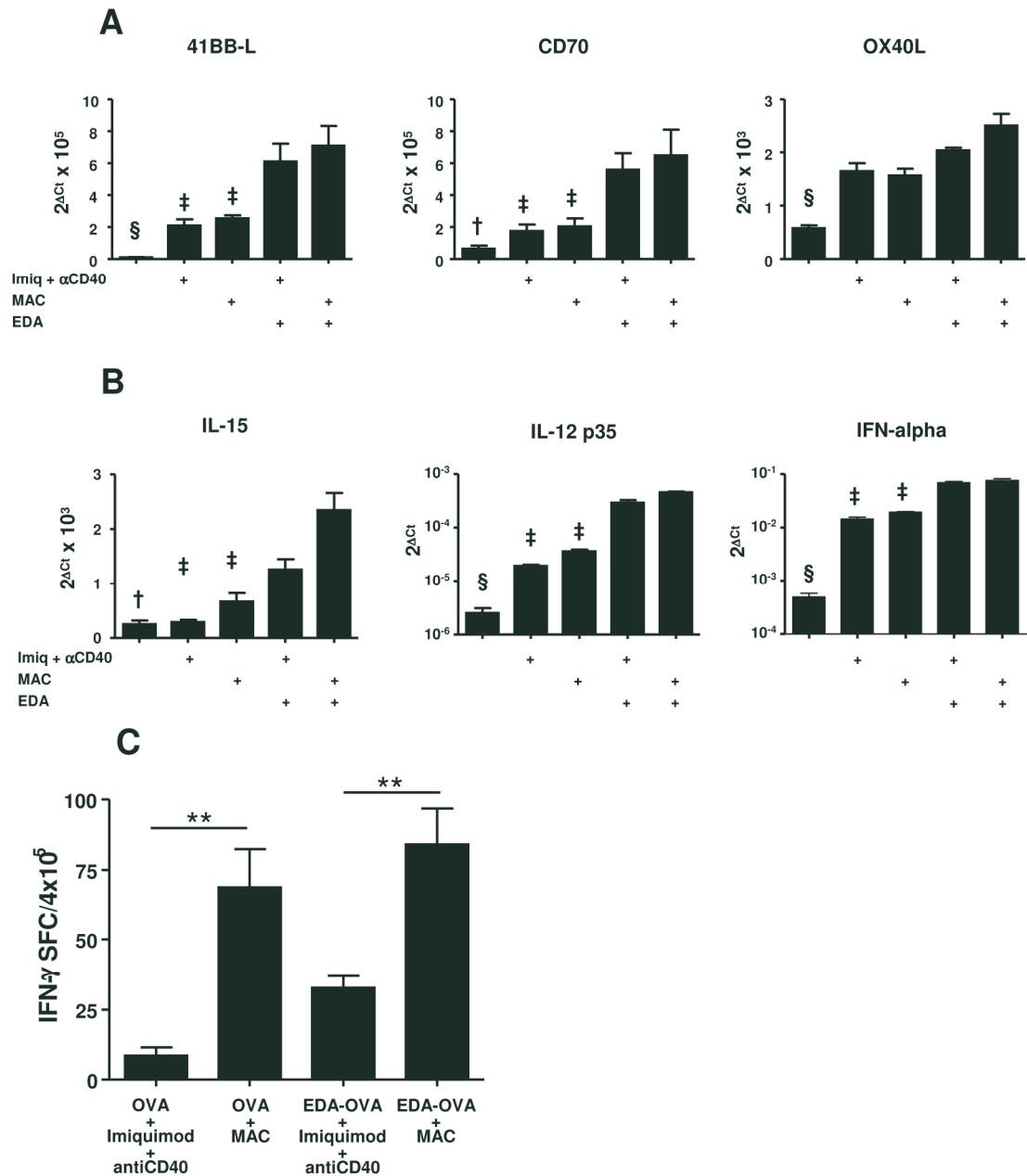
Supplementary Figure S1.

Figure 1. Immunization with OVA plus poly(I:C) and antiCD40 does not protect mice against the challenge with B16-OVA cells. C57BL/6 mice (n=6 per group) were immunized i.v. with OVA plus poly(I:C) and anti-CD40 or left untreated. Six days later they were challenged s.c. with 5×10^5 B16-OVA tumor cells and evolution of tumor growth was monitored twice per week. Graphs represent the average tumor volume per group of animals studied (A) and survival (B). (C) OVA expression in tumor cells (n= 6 culture wells) as measured by real time RT-PCR. Results are normalized with actin. (D) Analysis by flow cytometry of tumor cells stained with anti-MHC class I Kb molecules (open histogram) or control isotype (grey histogram).



Supplementary Figure S2.

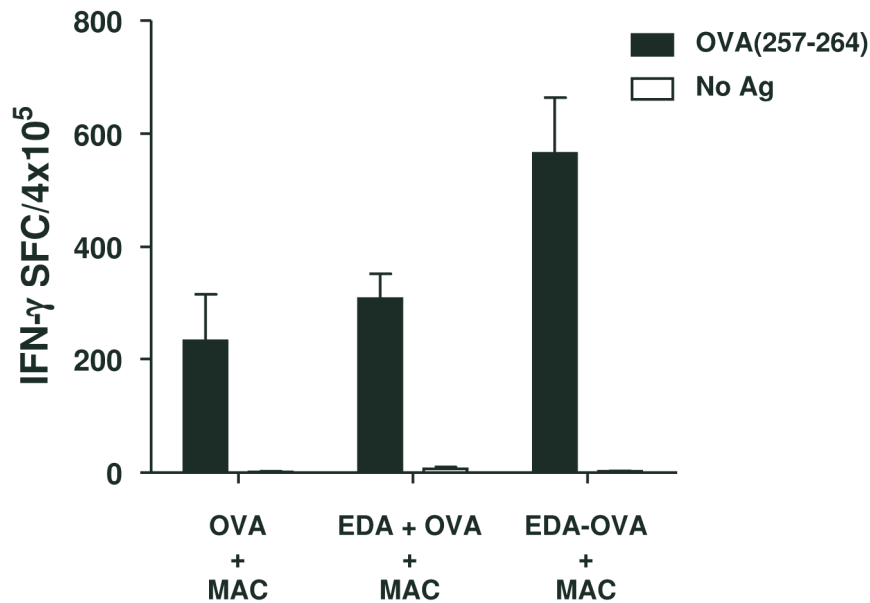
Administration of OVA with poly(I:C) plus anti-CD40 antibodies delays the growth of established B16-OVA tumors. C57BL/6 mice (n=6) were injected s.c. with 10^5 B16.OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated during a 20-day period with OVA plus poly (I:C) and anti-CD40. Average tumor volume per group of animals studied (A) and survival (B) are represented. (**; $P < 0.01$)



Supplementary Figure S3.

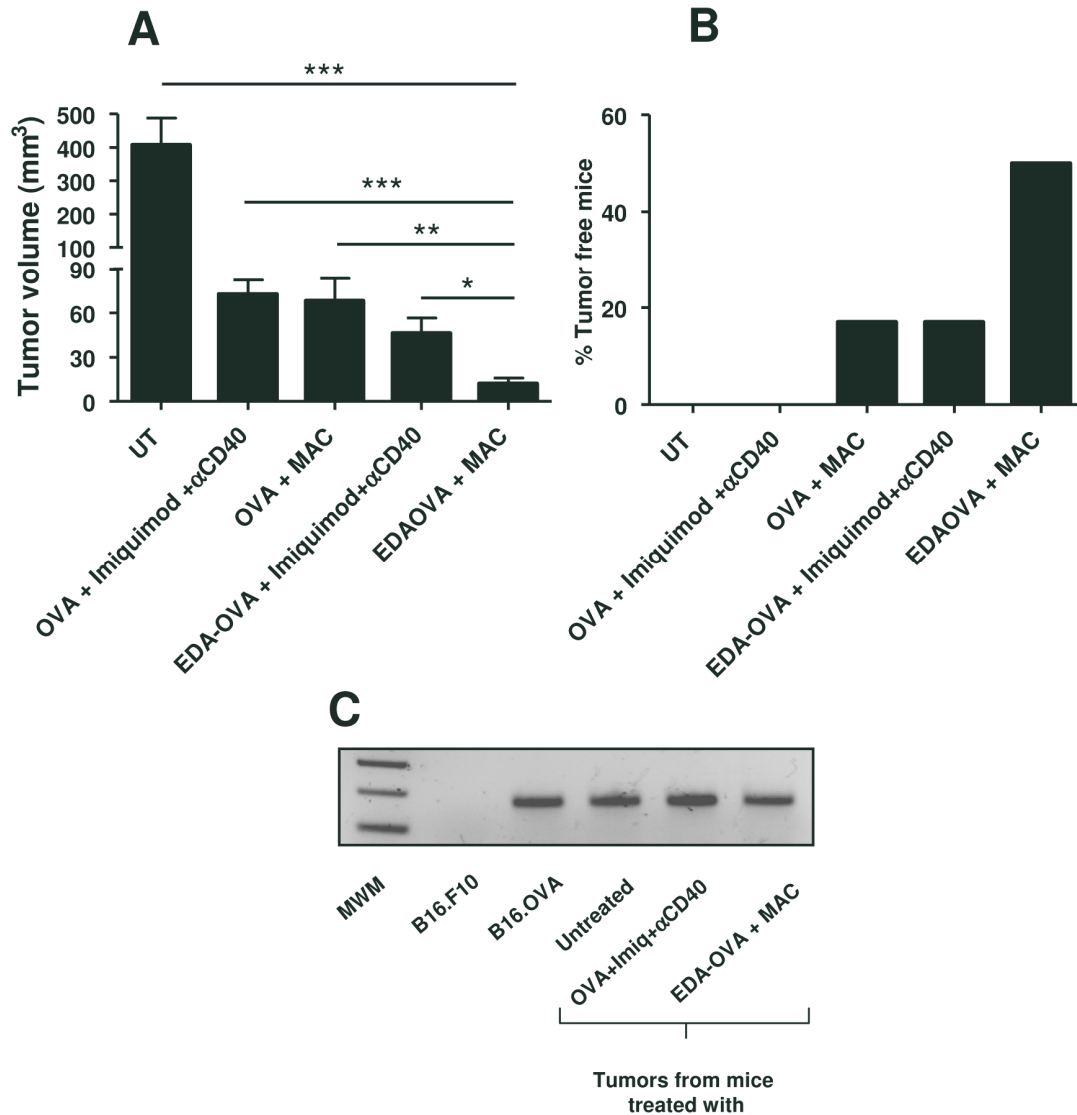
A multiple adjuvant combination plus antigen targeting strategy enhances innate immunity. DC were stimulated in vitro in 96-well plates (n=4 wells/group) with Imiquimod (5 μg/ml) and anti-CD40 (50 μg/ml), multiple adjuvant combination (MAC; Imiquimod, anti-CD40 and poly (I:C) (50 μg/ml)), EDA (2 μM) plus Imiquimod and anti-CD40 or EDA plus MAC and 5 h (A) or 24 h (B) later they were harvested and expression of different molecules was analyzed by real time RT-PCR. (A) Expression of mRNA of co-stimulatory molecules 4-

1BBL, CD70 and OX40L. (B) Expression of mRNA of cytokines IL-15, IL-12 p35 and IFN- α . (§ p<0.05 UT vs. remaining groups; ‡ p<0.05 Imiq + antiCD40 or MAC vs. Imiq + antiCD40 + EDA or MAC + EDA; † p<0.05 UT vs. Imiq + antiCD40 + EDA or MAC + EDA) (C) C57BL/6 mice (n=3) received a single administration of different adjuvant combinations. One day later they were sacrificed and activation of NK cells was measured as IFN- γ production against YAC-1 cells.



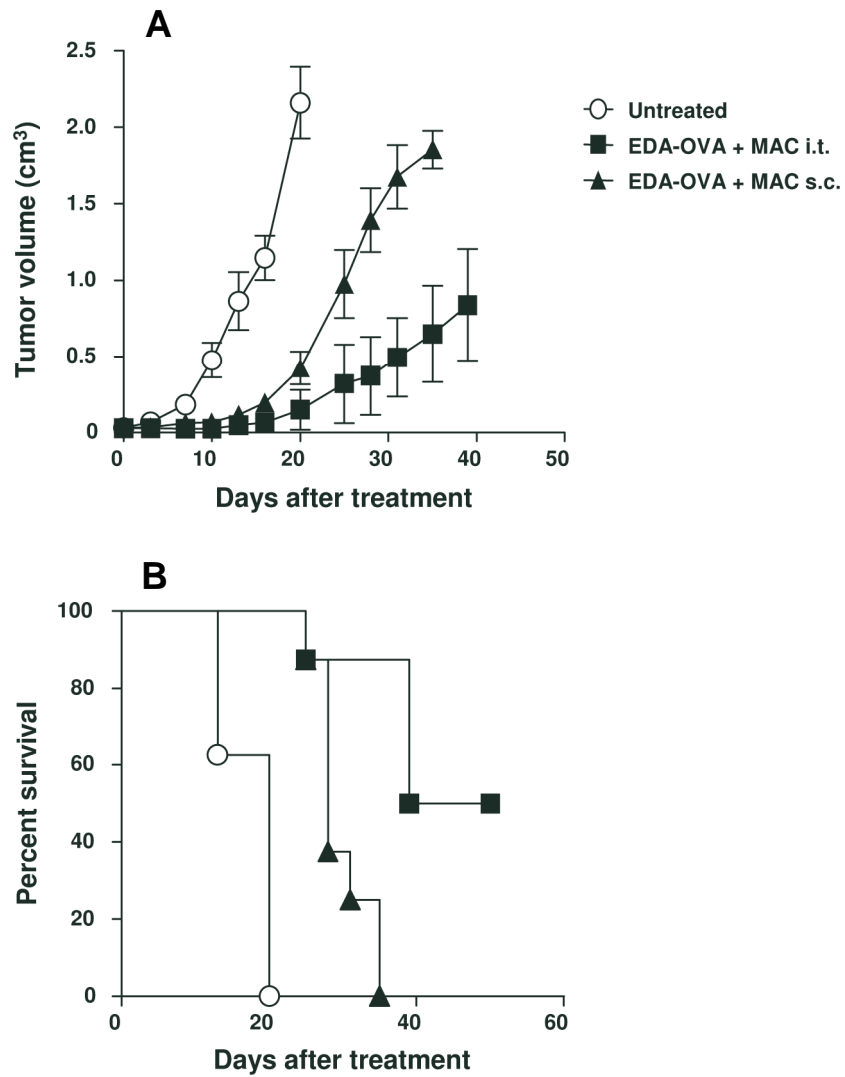
Supplementary Figure S4.

Conjugation of OVA antigen to EDA enhances the induction of T-cell responses. C57BL/6 mice (n=3) received a single administration of MAC (Imiquimod, poly (I:C) and anti-CD40) plus OVA (MAC + OVA) , MAC plus EDA and free OVA (MAC + EDA + OVA) or MAC plus EDA conjugated to OVA (MAC + EDA-OVA). Six days after immunization the number of IFN- γ producing cells was measured by ELISPOT after stimulation with OVA (257-264) peptide. Results are representative of one out of two independent experiments.



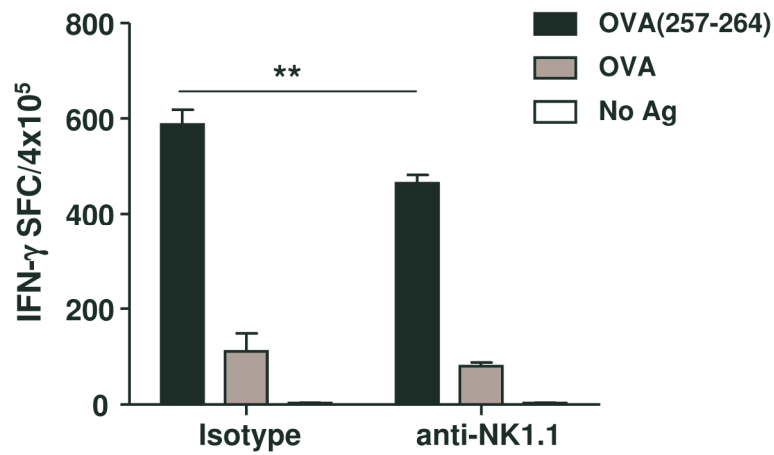
Supplementary Figure S5.

Antitumor effect of different adjuvant combinations. (A) C57BL/6 mice (n=12) were injected s.c. with 10^5 B16-OVA tumor cells and when tumor diameter reached 5 mm they were treated during a 10-day period with different antigen plus adjuvant combinations or left untreated. Graph represents average tumor volume per group of animals studied. (B) Percentage of tumor-free mice in experiment shown in A. (C) Expression of OVA mRNA by tumors from representative mice treated with different adjuvant combinations shown in A. As control B16.F10 and B16.OVA tumor cell lines were included.



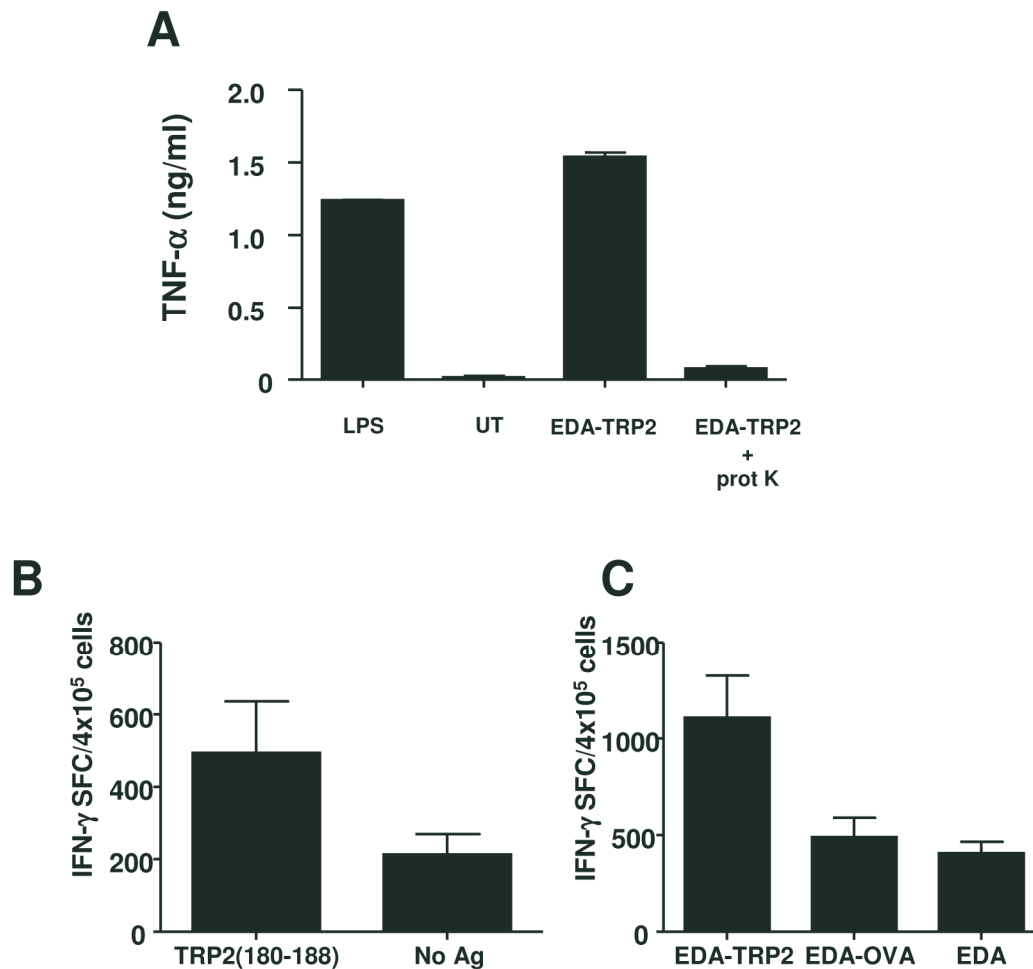
Supplementary Figure S6.

Tumor rejection induced by EDA-OVA + MAC adjuvant combination requires local administration. C57BL/6 mice (n=8) bearing 5 mm B16-OVA tumors were treated with EDA-OVA + MAC adjuvant combination by intratumor or subcutaneous route for three weeks or left untreated. Average tumor volume per group of animals studied (A) and survival (B) are represented.



Supplementary Figure S7.

Induction of CD8 T cell responses after immunization with EDA-OVA + MAC partially depends on NK cells. C57BL/6 mice (n=3) previously treated with depleting antibodies against NK1.1 or isotype control received a single immunization with EDA conjugated to OVA plus MAC (Imiquimod, poly (I:C) and anti-CD40). Six days later the number of IFN- γ producing cells was measured by ELISPOT after stimulation with OVA (257-264) peptide or OVA protein (**; $P < 0.01$).



Supplementary Figure S8.

EDA-TRP2 protein activates innate and adaptive immunity. Plasmid pET20b-EDA-TRP2 (59-257), expressing a fusion protein containing amino acids 59-257 from TRP2 linked to the C-terminus of EDA and six histidines was made by using plasmid pET20b-EDA as described (Mansilla et al, J Hepatol, 2010). EDA-TRP2 (59-257) was purified from inclusion bodies (8M urea-20mM HEPES) by a semi-preparative isoelectrofocussing (Rotofor, Biorad) followed by affinity chromatography using Nickel Sepharose 6 Fast flow resin (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden). The resulting protein was refolded in a sepharose G25 column using a urea gradient size-exclusion chromatography and purified from endotoxins by using Endotrap columns (Profos Ag, Regensburg, Germany). Purified protein was analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (Bio-Safe Coomassie reagent, Bio-Rad, Hercules, CA). (A) The activity of EDA-TRP2 (59-257), from now on denominated EDA-

TRP2, was tested in vitro using THP-1 monocyte cell line. THP-1 cells were plated at 10^6 cells/well and cultured with EDA-TRP2 (1 μ M), EDA-TRP2 previously digested with proteinase-K (using agarose-proteinase K beads according to manufacturer's instructions (Sigma, St Louis)), LPS (0,1 μ g/ml) or left untreated (UT) in culture medium for 15 hours. Human TNF- α released to the medium by THP-1 cells in response to the stimuli was measured by ELISA (BD-Biosciences). (B-C) C57BL/6 mice (n=3) were immunized with EDA-TRP2 + MAC and one week later splenocytes were stimulated with CD8 epitope TRP2 (180-188) (B) or with EDA-TRP2 (C) and IFN- γ production was measured in ELISPOT assays.

Supplementary Table S1.

Primer sequences used for real-time PCR analyses

Gen	Sense primer (5' - 3')	Antisense primer (5' - 3')
<i>OVA</i>	TATTCGTTTCAGCCTTGCCAG	CTTCTCCCCACAGTCCTTTG
<i>OX40L</i>	AGTGGAAGAAGACGCTAAGG	TCCTCACATCTGGTAACTGC
<i>4-1BBL</i>	AGTCGCTTTGGTTTTGCTGC	ACGATGCTTGGTTTTTAGCC
<i>CD70</i>	CTCAGTAAGCAGCAACAGAG	TTGATGGATACGCAGATGGC
<i>IL - 15</i>	TAACTGAGGCTGGCATTTC	GGGATGAAAGTCACTGTC
<i>IL - 12 p35</i>	CACGCTACCTCCTCTTTTTTG	AGGCAACTCTCGTTCTTGTG
<i>IFN - alpha</i>	TCTYTCYTGCTGAAGGAC	CACAGRGGCTGTGTTTCTTC
<i>β-actin</i>	CGCGTCCACCCGCGAG	CCTGGTGCCTAGGGCG

ANEXO II: Patente



Por la presente, **CERTIFICO QUE D. Fernando ARANDA VEGA** es
coinventor de la solicitud de patente cuyos datos registrales son los siguientes:

TITULO: Compositions based on the fibronectin extracellular domain A for
the treatment of melanoma.

Nº SOLICITUD PRIORITARIA: EP 10382036.1; **Fecha:** 16/2/2010

INVENTORES: Fernando ARANDA VEGA, Juan José LASARTE
SAGASTIBELZA, Diana LLOPIZ KHATCHIKIAN, Jesús María PRIETO
VALTUEÑA, Pablo SAROBE UGARRIZA

Países con patente en trámite: PCT

El orden de inventores no indica prelación alguna respecto a la participación en la invención.

Y para que así conste a petición del interesado, firmo el presente certificado
en Pamplona el 13 de junio de 2012.



FUNDACIÓN PARA LA
INVESTIGACIÓN MÉDICA APLICADA

Francisco ERRASTI GOENAGA
Director General del CENTRO PARA LA
INVESTIGACIÓN MÉDICA APLICADA

