



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Inmunoterapia del càncer colorrectal mediante la combinació de fàrmacos bloqueantes de la vía PD-1/PD-L1 y vacunas de células dendríticas autólogas

Marta Español Rego

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Facultad de Medicina

Departamento de Biomedicina

**INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER COLORRECTAL
MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS
BLOQUEANTES DE LA VÍA PD-1/PD-L1 Y VACUNAS DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS**

Marta Español Rego

Memoria de tesis doctoral

2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Biomedicina

**INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER COLORRECTAL
MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS
BLOQUEANTES DE LA VÍA PD-1/PD-L1 Y VACUNAS DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS**

Memoria de tesis doctoral presentada por **Marta Español Rego** para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona.

Fdo.: **Marta Español Rego**
Doctoranda

Director:

Fdo.: **Dr. Daniel Benítez Ribas**
IDIBAPS

Tutor:

Fdo.: **Dr. Pablo Engel Rocamora**
Universitat de Barcelona

Barcelona, Junio de 2023, Universitat de Barcelona

A mi familia

Cada día sabemos más y entendemos menos.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Son demasiadas las personas a las cuales tengo que agradecerles el haber llegado hasta aquí. No me caben en estas líneas todos esos nombres, y seguro que con mi mala memoria me dejo alguno por el camino, pero vosotros sabéis quiénes sois.

En primer lugar, a mi familia. No puedo tener unos padres mejores, que me quieren y me apoyan siempre de manera incondicional, a pesar de que su hija pequeña este más lejos de lo que les gustaría y vaya a verlos menos a menudo de lo que debería... y a mis hermanas, por ser siempre un referente, ayudarme en todo, protegerme y aguantarme todas mis rarezas.

A Dani, por acogerme y dejarme formar parte de este proyecto. Por su graaaaan paciencia con una persona tan dispersa como yo.

A mis Rs mayores, por acogerme cuando llegué a Barcelona y enseñarme tantas cosas dentro y fuera del laboratorio. A mis Rs pequeños, por formar un gran equipo y no querer dejar nunca de aprender. Por su infinita paciencia y tolerancia, por enseñarme a expandir los límites de mi paciencia, por confundirme tanto, por demostrarme lo bonito que puede ser no estar de acuerdo y por demostrarme también que las primeras impresiones pueden estar equivocadas (y tanto...).

Al *DC team*, por introducirme en el mundo de las dendríticas y a todo el *immunotherapy team*, por enseñarme tantas cosas. A mis compis de despacho, por convertir un cubículo sin ventanas, sin sol y sin espacio en un lugar mucho más agradable de lo esperado y al que siempre tengo ganas de volver.

A todas las personas del servicio de inmuno, por ser unos grandísimos profesionales y dejarme aprender de ellos, por su aguante conmigo y también por saber divertirse cuando se puede. En especial a aquellos que han seguido confiando en mi cuando era difícil hacerlo.

A todo el inmunoequipo, por formar una familia que es increíble en los momentos buenos, pero aún mejor en los malos. Por esas barbacoas, esos clubs de lectura, esas visitas a la 12 (aunque en la terraza se esté mucho mejor), esas excursiones al plaer, esos zooms de pandemia, esos viajes, esas resacas, esos disfraces, esos "tú y tú..." (Ana, siempre presente).

A Clarta, mi querida media naranja, por ser Clarta. Ya sea presenciando cómo se chamusca una centrífuga, en una de nuestras innumerables meriendas, como compi de piso, como organizadoras de eventos varios, viajando a una villa o una iglesia, con chófer o como ovillos traseros, degustando un menú de estrellas o de pan de molde con chorizo... por ser mi cómplice, por no decir nunca que no y por proponer los mejores planes.

A las ilus, por tantas meriendas y viajes inolvidables y por saber reírnos hasta el infinito de nosotras mismas. A las señoras, por hacer que Clartifer sea el mejor equipo. A las braveras, por conseguir que todo siga igual a pesar de la distancia y los calendarios imposibles. A Nartazu, por esos respiros gastronómicos y por saber lo que me pasa antes que yo misma.

A todos los que me habéis aguantado en mis días bordis, lo siento. A los que a pesar de ello habéis seguido ahí, gracias.

A todos vosotros, que pensábamos que este día nunca llegaría... por fin, a celebrarlo!

ÍNDICE

Índice

I. Introducción	1
1. Historia de la inmunoterapia antitumoral	3
2. Sistema inmunitario y tumores	5
2.1. Antígenos tumorales	7
2.1.1. Productos de genes mutados	8
2.1.2. Proteínas celulares no mutadas, pero expresadas de forma anómala	8
2.1.3. Antígenos de virus oncogénicos	8
2.1.4. Antígenos oncofetales	9
2.1.5. Antígenos glucolípidicos y glucoproteínicos alterados	10
2.1.6. Antígenos de diferenciación específicos de tejidos	10
2.2. Mecanismos efectores (respuesta inmunitaria frente a los tumores)	10
2.2.1. Linfocitos T	11
2.2.2. Anticuerpos	13
2.2.3. Células NK	13
2.2.4. Macrófagos	13
2.3. Mecanismos de evasión tumoral	13
2.3.1. Pérdida de la expresión de antígenos tumorales	14
2.3.2. Inhibición activa de la respuesta inmunitaria	17
2.3.3. Papel del sistema inmunitario en la promoción del crecimiento tumoral	19
3. Células dendríticas	20
3.1. Subtipos de células dendríticas	21
3.1.1. Células dendríticas clásicas	21
3.1.1.1. cDC1	22
3.1.1.2. cDC2	22
3.1.2. Células dendríticas plasmacitoides	23
3.1.3. Células dendríticas derivadas de monocitos	24
3.2. Presentación de antígenos	24
3.2.1. Captura del antígeno	25
3.2.2. Transporte del antígeno	27
3.2.3. Presentación del antígeno	27
3.3. Activación de los linfocitos T	30
3.4. Papel de las DCs en el desarrollo de tumores	32
3.4.1. Actividad antitumoral de las células dendríticas	32
3.4.2. Tolerancia hacia el tumor generada por las células dendríticas	33
3.4.3. Inhibición de las células dendríticas en el microambiente tumoral	34
3.4.4. Relación entre células dendríticas y terapias antitumorales	35
3.4.4.1. Quimioterapia	36
3.4.4.2. Radioterapia	37
3.4.4.3. <i>Checkpoints inhibitors</i>	37
3.4.4.4. Terapia celular adoptiva	37
4. Estrategias de inmunoterapia del cáncer	38
4.1. Inmunoterapia activa	39
4.1.1. Vacunas	39
4.1.2. Bloqueantes de las vías inhibitorias	40
4.1.3. Administración de citocinas	40
4.1.4. Estimulación inespecífica	41
4.2. Inmunoterapia pasiva	41
4.2.1. Terapia celular adoptiva	41
4.2.1.1. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)	42
4.2.1.2. TCR transgénicos (tTCRs)	44
4.2.1.3. CARTs	45
4.2.2. Efecto de injerto contra leucemia	49

4.2.3. Anticuerpos antitumorales -----	49
5. Checkpoint inhibitors -----	51
5.1. Inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 -----	57
5.2. <i>Checkpoints inhibitors</i> en cáncer colorrectal-----	60
6. Vacunas de células dendríticas-----	67
6.1. Elección de la fuente de antígenos tumorales-----	69
6.2. Preparación y administración de células dendríticas -----	70
6.3. Terapia combinada con células dendríticas-----	73
6.4. Vacunas de células dendríticas en el tratamiento del cáncer colorrectal -----	75
6.5. Limitaciones de la terapia con células dendríticas-----	76
7. Cáncer colorrectal -----	77
II. Hipótesis y Objetivos-----	85
III. Materiales y Métodos-----	89
1. Estudios <i>in vitro</i> (pre-clínica): -----	91
1.1. Cultivos celulares:-----	91
1.1.1. Obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica -----	91
1.1.2. Criopreservación de células-----	94
1.1.3. Descongelación de células -----	94
1.1.4. Mantenimiento de células en cultivo-----	94
1.1.4.1. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) -----	94
1.1.4.2. Líneas tumorales -----	95
1.1.4.3. Ensayos de proliferación celular con timidina tritiada-----	95
1.2. Muestras de pacientes-----	96
1.2.1. Biopsias tumorales-----	96
1.2.1.1. Procesamiento de la biopsia (y obtención de la suspensión celular)-----	97
1.2.1.2. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) -----	97
1.2.1.3. Líneas tumorales (obtención y caracterización)-----	99
1.2.1.4. Organoides -----	100
1.2.1.5. Lisado tumoral (obtención e irradiación) -----	101
1.2.1.6. Sangre periférica (DCs y PBLs)-----	102
2. Ensayo clínico -----	102
2.1. Diseño del ensayo clínico-----	102
2.2. Pacientes-----	104
2.3. Tratamientos del ensayo-----	105
2.3.1. Vacuna de células dendríticas autóloga-----	105
2.3.2. Avelumab -----	105
2.4. Monitorización de la respuesta inmunitaria a la terapia combinada-----	106
2.4.1. Muestras obtenidas -----	106
2.4.1.1. Biopsias tumorales-----	106
2.4.1.2. Sangre periférica -----	107
2.4.2. Determinación de citocinas mediante LUMINEX (suero)-----	107
2.4.3. Ensayos de proliferación celular con timidina tritiada-----	109
2.4.3.1. Determinación de citocinas mediante ELISA en los sobrenadantes de las proliferaciones linfocitarias -----	110
2.4.4. Estudio de subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)-----	111
2.4.5. Estudio del fenotipo de las células dendríticas-----	112
2.4.6. RNAseq: <i>immune signatures</i> -----	113
2.4.7. Tipificación HLA-----	113
2.5. Evaluación de la eficacia clínica del tratamiento-----	113
2.5.1. Evaluación tumoral -----	114
2.5.2. Hiperprogresión tumoral-----	114
2.6. Estadística -----	115

IV. Resultados	117
1. Pre-clínica:	119
1.1. Estudios de inmunogenicidad <i>in vitro</i>	119
1.2. Caracterización del microambiente tumoral en pacientes con CCR	122
1.2.1. Características de los pacientes	122
1.2.2. Biopsias tumorales	122
1.2.2.1. Obtención y caracterización de TILs	122
1.2.2.2. Obtención y caracterización de líneas tumorales	125
1.2.2.3. Obtención de organoides	129
1.2.2.4. Obtención del lisado tumoral	129
1.2.3. Sangre periférica	129
2. Ensayo clínico	130
2.1. Características de los pacientes	130
2.2. Tratamientos administrados	133
2.2.1. Avelumab	133
2.2.2. Vacuna de células dendríticas	133
2.3. Evaluación de la eficacia clínica de la terapia combinada	135
2.3.1. Supervivencia libre de progresión	135
2.3.2. Supervivencia global	138
2.4. Monitorización de la respuesta inmunitaria	139
2.4.1. Generación de TILs y líneas tumorales	140
2.4.2. Citocinas	142
2.4.2. Proliferaciones linfocitarias	145
2.4.3. Subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)	148
2.4.4. RNAseq: <i>immune-signatures</i>	150
2.4.5. Tipificación HLA	155
2.5. Detección de biomarcadores de respuesta al tratamiento combinado	157
2.5.1. Citocinas	157
2.5.2. Proliferaciones linfocitarias	165
2.5.3. Subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)	166
2.5.4. Fenotipo de las células dendríticas presentes en la vacuna terapéutica	169
2.5.5. RNAseq: firmas de expresión inmunitarias	173
2.5.6. Evaluación del papel del HLA	178
V. Discusión	185
VI. Conclusiones	199
VII. Bibliografía	203
VIII. Anexos	231

ABREVIATURAS

ADA	<i>anti-drug antibodies</i> , anticuerpos anti-fármaco.
ADCV	<i>autologous dendritic cell vaccine</i> , vacuna de células dendríticas autóloga
AFP	alfa-fetoproteína
APCs	<i>antigen presenting cells</i> , células presentadoras de antígenos,
ATP	adenosín trifosfato
β-HCG	<i>beta human chorionic gonadotropin</i> , gonadotropina coriónica humana
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
c-MET	<i>mesenchymal-epithelial transition factor</i> , factor de transición mesenquimal-epitelial
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> , receptor de antígeno quimérico
CART	receptor antigénico quimérico de linfocitos T
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i> , ligando de quimiocina C-C
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i> , receptor de quimiocinas tipo 2
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 2</i> , receptor de quimiocinas tipo 2
CCR	cáncer colorrectal
CCRm	cáncer colorrectal metastásico
CD	<i>cluster of differentiation</i> , cluster de diferenciación
CDB	Centro de Diagnóstico Biomédico
cDC1	células dendríticas convencionales tipo 1
cDC2	células dendríticas convencionales tipo2
cDC3	células dendríticas convencionales tipo 3
cDCs	células dendríticas convencionales
CDRs:	<i>complementary determining regions</i> , regiones determinantes de complementariedad
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i> , antígeno carcinoembrionario
CIN	<i>chromosomal instability</i> , inestabilidad cromosómica
CMS	<i>consensus molecular subtypes</i> , subtipos moleculares consenso
CR	<i>complete response</i> , respuesta completa
CTCAE	<i>common terminology criteria for adverse events</i> , criterios comunes para la evaluación de las reacciones adversas
CTL	linfocitos T citotóxicos
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> , ligando de quimiocina con motivo C-X-C
DAMP	<i>danger associated molecular patterns</i> , patrones moleculares asociados al peligro

DC	<i>dendritic cell</i> , célula dendrítica
DNA	ácido desoxirribonucleico
dMMR	<i>deficient mismatch repair</i> , mecanismos de reparación deficientes
ECOG	eastern cooperative oncology group
EE	enfermedad estable
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> , molécula de adhesión celular epitelial
FasL	Fas ligando (CD95L)
FDA	<i>food and drug administration</i> , administración de alimentos y medicamentos
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> , tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina
FLT3L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i> , ligando de tirosin kinasa 3 relacionado con FMS
GEP	<i>gene expression profile</i> , perfil de expresión génica
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related</i> , proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related ligand</i> , ligando de GITR
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GUCY2C	guanilil ciclasa C
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> , factor de crecimiento de hepatocitos
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , antígeno leucocitario humano
HMGB1	<i>high mobility group protein B1</i> , proteína B1 del grupo de alta movilidad
HS	<i>human serum</i> , suero humano
HSP90	<i>heat shock protein 90</i> , proteína de choque térmico de 90
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i> , telomerasa transcriptasa inversa humana
HTLV-1	virus linfotrófico de los linfocitos T humanos 1
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> , molécula de adhesión intercelular 1
ICIs	<i>immune checkpoint inhibitors</i> , inhibidores de punto de control inmunitario
ICOS	<i>inducible coestimulator (CD278)</i> , coestimulador inducible
ICOS-L	ligando de ICOS (CD275)

iDCs	células dendríticas inmaduras
IDO1	indolamina 2,3-dioxigenasa 1
IFN-α	interferón alfa
IFN-γ	interferón gamma
Ig	inmunoglobulina
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> , factor de crecimiento similar a la insulina
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> , receptor de IGF1
IL	interleucina
IL13Rα2	receptor α 2 de la interleucina 13
IMMETCOLS	<i>immune-metabolic signature</i> , firma inmuno-metabólica
LAG3	<i>lymphocyte activation gene 3</i> , gen de activación de linfocitos tipo 3
LAK	<i>lymphokine-activated killer</i> , células asesinas activadas por linfocinas
LDH	lactado deshidrogenasa
LLA	leucemia linfática aguda
LS	<i>long survivals</i> , largos supervivientes
LT	linfocitos T
MAGE-3	<i>melanoma associated antigen 3</i> , antígeno 3 asociado a melanoma
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i> , proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2)
mDCs	células dendríticas maduras
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i> , células supresoras mielocíticas
MF	macrófago
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , intensidad media de fluorescencia
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , complejo mayor de histocompatibilidad
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9</i> , matriz metalopeptidasa 9
moAbs	<i>monoclonal antibodies</i> , anticuerpos monoclonales
MoDCs	células dendríticas derivadas de monocitos
MSI	<i>microsatellite instability</i> , inestabilidad de microsatélites
MSS	<i>microsatellite stability</i> , estabilidad de microsatélites
MUC1	mucina 1
NE	no evaluable
NK	células <i>natural killer</i>
NY-ESO-1	<i>New York esophageal squamous cell carcinoma 1</i>
OS	<i>overall survival</i> , supervivencia global
OX40L	ligando de OX40

PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> , patrón molecular asociado a patógeno
PBLs	<i>peripheral blood lymphocytes</i> , linfocitos de sangre periférica
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , células mononucleares de sangre periférica
PCR	proteína C reactiva
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i> , ligando 1 de muerte programada
PD-L1	ligando de PD-1
PD-L2	ligando de PD-2
PD	<i>progression of disease</i> , progresión de la enfermedad
pDCs	células dendríticas plasmacitoides
PE	progresión de la enfermedad
PFS	<i>progression free survival</i> , supervivencia libre de progresión
PGE2	prostaglandina E2
pMMR	<i>proficient mismatch repair</i> , mecanismos de reparación competentes
POLE	polimerasa e
PR	<i>partial response</i> , respuesta parcial
PSA	penicilina-estreptomicina-anfotericina
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> , regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (CCL5)
RECIST	<i>response evaluation criteria in solid tumors</i> , criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
RNF43	<i>ring finger protein 43</i> , proteína del dedo anular 43
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
SART3	<i>squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells</i> , antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por las células T
scFv	<i>single chain variable fragment</i> , fragmento variable de cadena única
SD	<i>stable disease</i> , enfermedad estable
SDF1a	stromal cell-derived factor 1, factor 1a derivado de células del estroma (CXCL12)
SI	<i>stimulation index</i> , índice de estimulación
SIRPa	<i>signal-regulatory protein a</i> , proteína a reguladora de señales
SS	<i>short survivals</i> , cortos supervivientes
SSO	<i>sequence specific oligonucleotides</i> , oligonucleótidos específicos de secuencia

TAA	<i>tumor associated antigens</i> , antígenos asociados a tumores
TAC	tomografía computarizada
TAG-72	<i>tumor-associated glycoprotein 72</i> , glucoproteína 72 asociada a tumor
TAMs	<i>tumor associated macrophages</i> , macrófagos asociados a tumor
TCR	<i>T cell receptor</i> , receptor de linfocitos T
TGF	<i>transforming growth factor</i> , factor de crecimiento transformante
TGFβII	TGF-β tipo II
Th1	linfocitos T helper tipo 1
Th17	linfocitos T helper tipo 17
Th2	linfocitos T helper tipo 2
TILS	<i>tumor infiltrating lymphocytes</i> , linfocitos infiltrantes de tumor
TIM3	<i>T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i> , inmunoglobulina de células T y la proteína que contiene el dominio de mucina
TLR	<i>toll like receptor</i> , receptor de tipo toll
TMB	<i>tumor mutational burden</i> , carga mutacional tumoral
TME	<i>tumor microenvironment</i> , microambiente tumoral
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alfa</i> , factor de necrosis tumoral alfa
TOMM34	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 34</i> , translocasa de la membrana mitocondrial externa 34
Treg	linfocito T regulador
TSA	<i>tumor specific antigens</i> , antígenos específicos de tumores
tTCR	TCR transgénico
ULN	<i>upper limit normal</i> , límite superior de normalidad
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , proteína de adhesión de células vasculares 1
VEB	virus Epstein-Barr
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , factor de crecimiento del endotelio vascular
VHS	virus del herpes simple
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VISTA	<i>V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation</i> , supresor de Ig de dominio V de la activación de células T
VPH	virus del papiloma humano
WT1	<i>Wilms tumor protein 1</i> , proteína 1 del tumor de Wilms

Tesis en formato clásico con 1 artículo anexo

La tesis consta de 3 objetivos y 1 artículo

- Autores: **Español-Rego M**, Fernández-Martos C, Elez E, Foguet C, Pedrosa L, Rodríguez N, Ruiz-Casado A, Pineda E, Cid J, Cabezón R, Oliveres H, Lozano M, Ginés A, García-Criado A, Ayuso JR, Pagés M, Cuatrecasas M, Torres F, Thomson T, Cascante M, Benítez-Ribas D, Maurel J.
- Título: A Phase I-II multicenter trial with Avelumab plus autologous dendritic cell vaccine in pre-treated mismatch repair-proficient (MSS) metastatic colorectal cancer patients; GEMCAD 1602 study.
- Revista: Cancer Immunology Immunotherapy. 2023 Apr;72(4):827-840
- doi: 10.1007/s00262-022-03283-5
- Factor de impacto: 6,63
- Quartil: Q1

I. Introducción

1. Historia de la inmunoterapia antitumoral

A lo largo de la historia se han descrito numerosos casos de regresiones tumorales tras infecciones o episodios febriles, ya desde el antiguo Egipto hasta principios del siglo XVIII, aunque las bases científicas de la modulación del sistema inmunitario para el tratamiento del cáncer datan de finales del siglo XVIII, gracias a la aparición de las técnicas histológicas. Ya en el siglo XIX, los alemanes Busch y Fehleisen reportaron, de manera independiente, cómo pacientes que habían sufrido infecciones por erisipelas experimentaban regresión del tumor (1,2).

Los primeros registros médicos en los cuales se tiene constancia del uso del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer datan de finales del siglo XIX, publicados por el cirujano William Coley, el llamado “Padre de la Inmunoterapia del Cáncer”. Basándose en observaciones previas de sus colegas alemanes y en las suyas propias de que los pacientes con cáncer que sufrían alguna infección experimentaban mejoría, y fijándose especialmente en la conexión que existía entre aquellos que padecían erisipelas y la remisión de sarcomas de tejidos blandos, Coley decidió inyectar bacterias *Streptococcus pyogenes* directamente en el tumor de un paciente afecto de sarcoma. Repitió el procedimiento durante 1 año y consiguió una regresión tumoral, logrando una supervivencia del paciente de 8 años (3). Durante los años posteriores, fue modificando y mejorando el cóctel bacteriano utilizado hasta crear un extracto inactivado de *S. pyogenes* y *Serratia marcescens* (una combinación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con grandes propiedades inmunoestimulantes) denominada como la “toxina de Coley”, con la cual siguió experimentando en diversos pacientes (4,5). Los resultados obtenidos fueron muy variables y en algunos casos se produjeron efectos adversos de gravedad (6). Esta falta de reproducibilidad, junto con la aparición de nuevas terapias antitumorales como la quimioterapia y la radioterapia, hicieron que el uso de esta práctica no se extendiera más allá y se abandonó, aunque gracias a su labor pionera, la propia hija de Coley, Helen Coley Natus, fundó en 1953 el *Cancer Research Institute* de Nueva York, dedicado al desarrollo de tratamientos de inmunoterapia contra el cáncer. Habría que esperar casi un siglo para pudiéramos volver a ver el uso de bacterias en el tratamiento del cáncer, cuando el grupo de Morales demostró la eficacia del tratamiento del cáncer de vejiga usando bacterias *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (7).

Más tarde, ya en el siglo XX, el concepto de inmunoterapia del cáncer resurgió gracias a la hipótesis de “vigilancia inmunitaria” propuesta inicialmente por Paul Ehrlich, quien postulaba que el sistema inmunitario estaba constantemente destruyendo células tumorales en nuestro

organismo (8). Sin embargo, no fue hasta décadas más tarde, cuando MacFarlane Burnet y Lewis Thomas plantearon de manera independiente esta teoría de la inmunovigilancia antitumoral con bases celulares y moleculares (9). Según la teoría de Burnet, en animales longevos los cambios genéticos heredables representarían un paso hacia la malignidad, con lo que deberían existir mecanismos para eliminar estas células mutantes potencialmente dañinas, postulando que esos mecanismos eran de carácter inmunológico, gracias a que las células tumorales poseían nuevos antígenos que provocaban una reacción inmunitaria capaz de lograr la regresión tumoral sin dejar indicios clínicos de su existencia.

Posteriormente surgieron numerosos avances en al campo de la inmunología que permitieron señalar la importancia de la relación entre el sistema inmunitario y el cáncer: la caracterización de la respuesta inmune adaptativa con el importante papel ejercido por los linfocitos T (10), el descubrimiento de las células dendríticas y su papel en la inmunidad innata (11), la descripción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) y su restricción (12), o el papel citotóxico de las células *natural killer* (NK) (13).

Estos avances, junto con la demostración de que la inmunidad antitumoral podía ser transferida en ratones (14), así como las regresiones espontáneas de melanoma observadas en pacientes con enfermedades autoinmunes (15), hicieron que la teoría de la inmunovigilancia fuese cobrando fuerza, aunque no fue hasta finales del siglo XX cuando finalmente se afianzó gracias al avance de las técnicas bioquímicas y moleculares, así como los modelos murinos *knockout*, que demostraron la relación entre los déficits del sistema inmunitario y el cáncer y permitieron la identificación de la respuesta inmunitaria específica contra los tumores.

Ya en el siglo XXI, la importancia del papel ejercido por el sistema inmunitario en el cáncer, y su potencial uso como terapia antitumoral, se vio reforzado con el descubrimiento de los *immune checkpoints* y su aplicación en el tratamiento del cáncer mediante su bloqueo (16), consiguiendo años más tarde la aprobación de la FDA para ipilimumab en el tratamiento de melanoma (17), siendo la primera aprobación, a la que rápidamente seguirían otros, de este tipo de fármacos. Otros ejemplos de cómo la modulación del sistema inmunitario se ha llevado a la práctica clínica son la aprobación de la FDA de la primera vacuna con células dendríticas, sipuleucel-T, para el tratamiento del cáncer de próstata (18); o más recientemente, las estrategias de modificación genética de los linfocitos T, con la cual el grupo de Carl June consiguió inducir remisiones completas en pacientes con leucemia linfática crónica mediante el uso de *chimeric antigen receptors* (CARs) (19).

Actualmente, gracias a todos los hallazgos anteriormente mencionados, se reconoce la existencia de una respuesta inmunitaria contra el cáncer, que comienza con la detección de señales de peligro originadas durante el desarrollo tumoral y la liberación de antígenos tumorales. Estas señales estimulan en primera instancia a las células del sistema inmune innato, que a través de las células presentadoras de antígenos activarán a las células del sistema inmune adaptativo, principalmente los linfocitos T. Estos linfocitos, una vez activados tras haber entrado en contacto con los antígenos tumorales, migrarán a la zona del tumor, donde reconocerán a las células tumorales, proliferarán produciendo una infiltración de linfocitos específicos y finalmente destruirán el tumor (20).

En la actualidad continúan reportándose casos de pacientes que tras experimentar diversas infecciones, han desencadenado una respuesta anti-tumoral suficiente capaz de lograr la remisión espontánea del tumor que padecían (21), incluso el reciente virus SARS-CoV-2 se ha descrito como inductor de la remisión en un paciente con linfoma de Hodgkin (22).

A pesar de la capacidad del sistema inmunitario para reconocer al tumor, éste cuenta con mecanismos de evasión para seleccionar aquellas clonas tumorales que son resistentes a los mecanismos efectores del sistema inmunitario. Por ello, a pesar de la revolución que ha supuesto la aparición de la inmunoterapia como herramienta para combatir el cáncer, aún quedan mecanismos por comprender y dilucidar cómo sacarles el máximo partido para conseguir potenciar la capacidad antitumoral de nuestro sistema inmunitario, logrando así expandir el papel de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer a un rango más amplio de pacientes subtipos de tumores.

2. Sistema inmunitario y tumores

La importancia de la inmunovigilancia en la prevención del cáncer se conoce desde hace décadas (23,24). Se ha podido evidenciar cómo los individuos inmunodeprimidos, ya sean aquellos que padecen una inmunodeficiencia congénita, o adquirida (como los pacientes trasplantados o infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores (25).

Nuestro sistema inmunitario se encuentra constantemente patrullando a lo largo de nuestro organismo para detectar y eliminar células tumorales potencialmente dañinas. Numerosos estudios han demostrado la importancia de la inmunovigilancia en la prevención del cáncer (9). Sin embargo, a pesar de los mecanismos de nuestras células inmunitarias para detectar y eliminar estas células cancerosas, los tumores siguen desarrollándose aun en

individuos sanos e inmunocompetentes. Esto pone de manifiesto los complicados mecanismos e interacciones en el microambiente tumoral.

La presión que ejerce el sistema inmunitario sobre las células tumorales hace que el tumor se adapte y evolucione y se vuelva menos inmunogénico o desarrolle mecanismos de resistencia para poder progresar en un entorno inmunocompetente. Los tumores consiguen aprovecharse de los propios mecanismos del sistema inmunitario para luchar contra él y volverlos en su contra, ya sea favoreciendo una inflamación crónica que facilite la progresión del tumor, seleccionando las clonas tumorales menos inmunogénicas o sobre-expresando moléculas inhibitorias que en condiciones fisiológicas sirven para evitar una sobre-estimulación del sistema inmunitario que podría resultar dañina.

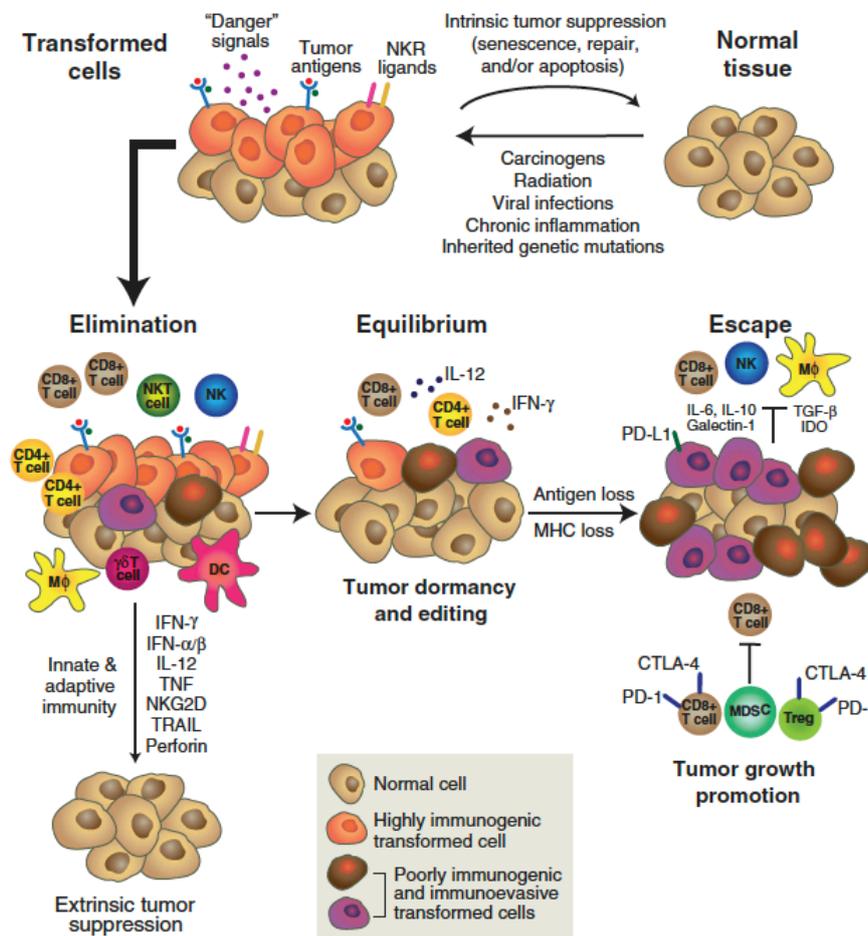


Figura I1. Teoría de la inmunoección del cáncer. Esta teoría consiste en 3 fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. Durante la fase de eliminación, el sistema inmune es capaz de destruir las células tumorales. Si alguna célula tumoral escapa a este primer proceso, entraríamos en la fase de equilibrio, mediado principalmente por el sistema inmune adaptativo, donde el tumor entra en un estado de quiescencia y sufre diversas adaptaciones y ediciones en cuanto a su inmunogenicidad. Debido a la presión ejercida por el sistema inmune durante la fase de equilibrio,

pueden aparecer variantes tumorales que acaban escapando a la respuesta inmune y el tumor pasa a la fase de escape y se hace clínicamente evidente. Adaptado de (26).

Así que, por un lado, la respuesta inmunitaria es eficaz eliminando tumores, pero al mismo tiempo, esa presión que ejerce sobre las células cancerígenas hace que se seleccionen aquellas células tumorales que puedan escapar a la respuesta inmunitaria y continuar su proliferación. Esto explica la supuesta paradoja que supone el desarrollo de tumores en individuos inmunocompetentes, y abrió las puertas al descubrimiento de las “vías de agotamiento” (*cell exhaustion*) de las células del sistema inmunitario inducidas por tumores (8).

Hay numerosos estudios que correlacionan una mayor presencia de infiltrado inmunitario en el tumor con un mejor pronóstico y supervivencia. En ocasiones, el valor pronóstico de la infiltración linfocitaria en el tumor es mayor que los métodos tradicionales histológicos y de estadiaje (27–29).

En muchas ocasiones, para entender mejor el papel que ejerce el sistema inmunitario en el desarrollo de los tumores se habla de la teoría de la “inmunoedición” del cáncer (30), que comprende 3 fases (**figura I1**).

Primero tendría lugar la fase de **eliminación**, durante la cual las células y mediadores del sistema inmunitario son capaces de eliminar a las células tumorales y frenar crecimiento del tumor; posteriormente estaría la fase de **equilibrio**, en la cual las células tumorales que han sobrevivido a la primera fase entran en un estado de equilibrio dinámico con el sistema inmunitario, de manera que éste no es capaz de eliminarlas por completo pero sí es capaz de frenar su proliferación, quedando en un estado latente (lo cual puede traducirse en que el sistema inmunitario acabe moldeando al tumor); y finalmente en la fase de **escape** las células tumorales que estaban en estado latente y han acumulado mutaciones y cambios suficientes comienzan a proliferar de manera incontrolada, sin que el sistema inmunitario sea capaz de controlarlas, lo cual se traduce en la aparición de un tumor maligno.

2.1. Antígenos tumorales

El hecho de que exista una inmunidad antitumoral específica, implica que el sistema inmunitario debe reconocer como extraños antígenos expresados en las células tumorales.

Tradicionalmente, se dividía a estos antígenos tumorales en 2 grandes grupos en función de su expresión: **antígenos específicos de tumores** (TSA, *tumor specific antigens*), aquellos que se expresan únicamente en células tumorales (ya sea de manera exclusiva en un individuo, o bien

compartidos por varios tumores); y **antígenos asociados a tumores** (TAA, *tumor associated antigens*), que también se expresan en células sanas, pero en las células tumorales lo hacen de manera aberrante o anómala (31).

Actualmente, la clasificación de los antígenos tumorales se basa en la estructura molecular y el origen de esos antígenos. En base a esto, podemos distinguir 5 grandes grupos, que se detallan a continuación.

2.1.1. Productos de genes mutados

Los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuando sufren mutaciones dan lugar a proteínas diferentes a las de las células normales, con lo que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria contra las mismas (32). Estas proteínas mutadas favorecen el desarrollo del fenotipo tumoral de las células, como por ejemplo los oncogenes RAS (33) y Bcr/Abl (34) o los genes supresores de tumores como p53 (35).

Dentro de este grupo también estarían aquellos antígenos producidos por genes mutados aleatoriamente que no están relacionados con el fenotipo de malignidad de las células, como por ejemplo aquellos inducidos por sustancias cancerígenas. Cualquier proteína mutada que pueda dar lugar a péptidos que se unan al MHC puede actuar como antígeno tumoral (31). Gracias a las técnicas de secuenciación masiva, se pueden conocer fácilmente los péptidos específicos de tumor de un paciente a partir de una muestra tumoral.

2.1.2. Proteínas celulares no mutadas, pero expresadas de forma anómala

Otro grupo de proteínas que puede actuar como antígenos tumorales son aquellas que se expresan también en células sanas, pero en el caso de las células tumorales lo hacen de manera anómala o aberrante (36). Por ejemplo, péptidos derivados de la melanina que se expresan en bajas concentraciones en melanocitos sanos, pero que se sobre-expresan en células de melanoma; o antígenos que sólo se expresan en células tumorales, trofoblastos y testículos, pero no en el resto de tejidos sanos. Como ejemplos de estos antígenos estarían las proteínas de las familias MAGE, BAGE y GAGE (37,38), así como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), una glucoproteína de gran relevancia en cáncer colorrectal (39) ya que se encuentra sobre-expresada en este tipo de tumor, asociándose a un peor pronóstico y menor supervivencia (40).

2.1.3. Antígenos de virus oncogénicos

Tanto los virus de DNA (ácido desoxirribonucleico) como los de RNA (ácido ribonucleico) están implicados en la aparición de distintos tumores (41). Puesto que los péptidos víricos son

antígenos extraños, estos se encuentran entre los más inmunogénicos. Además, estos antígenos son compartidos por todos los tumores inducidos por el mismo virus, por lo que se ha podido producir vacunas efectivas contra este tipo de tumores utilizando péptidos recombinantes procedentes de las cepas oncogénicas (42).

Como ejemplos de virus de DNA y su asociación con tumores, estarían el virus Epstein-Barr (VEB) con los linfomas (43,44), el virus del papiloma humano (VPH) con el carcinoma cervical (45,46) y orofaríngeo (47) o el virus del herpes simple (VHS) con el sarcoma de Kaposi (48). En cuanto a los virus de ARN, el único retrovirus humano conocido causante de tumores es el virus linfotrófico de los linfocitos T humanos 1 (HTLV-1), causante de leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto (49,50).

2.1.4. Antígenos oncofetales

Este tipo de antígenos son aquellos que se expresan de manera elevada en células tumorales y fetales, pero están prácticamente ausentes en tejidos adultos sanos. Se cree que la expresión de este tipo de proteínas se inhibe durante el desarrollo, y durante la transformación maligna de las células tumorales se suprime esta inhibición. Estos antígenos a menudo se utilizan como marcadores para el diagnóstico del cáncer, aunque también se pueden encontrar en pequeñas cantidades en células sanas o en diversas enfermedades inflamatorias.

Entre los antígenos oncofetales mejor caracterizados se encuentran el antígeno carcinoembrionario (CEA, *carcinoembryonic antigen*) y la α -fetoproteína (AFP), que se encuentran principalmente elevados en tumores del tracto digestivo (51) y en el carcinoma hepatocelular (52), respectivamente. CEA es uno de los antígenos tumorales más estudiados en cáncer colorrectal desde hace décadas (53). Los niveles séricos de estas proteínas pueden usarse para monitorizar la respuesta a un tratamiento antitumoral y vigilar la recurrencia del tumor, pero no son útiles como marcadores diagnósticos de cáncer ya que sus niveles pueden aumentar en enfermedades no neoplásicas, pudiendo ser detectados en el suero de individuos sanos (54,55). Otro antígeno de este grupo de gran importancia en el cáncer colorrectal es la gonadotropina coriónica humana β (β HCG, beta *human chorionic gonadotropin*), que se asocia con un aumento del crecimiento del tumor y su capacidad invasiva (56), incremento de metástasis (57) y disminución de la supervivencia (58) en este tipo de tumores.

2.1.5. Antígenos glucolipídicos y glucoproteínicos alterados

Diversas moléculas que se expresan en la superficie celular pueden sufrir modificaciones y favorecer el fenotipo maligno de las células tumorales, como la capacidad metastásica de las mismas. Estas moléculas alteradas son los gangliósidos (GM₂, GD₂ y GD₃, sobre-expresadas en neuroblastoma, melanoma o sarcoma (59)), los antígenos de los grupos sanguíneos y las mucinas (MUC-1, sufren una glicosilación de manera aberrante y se sobre-expresa en carcinomas epiteliales, principalmente mama y colon (60) o CA-125, expresadas en carcinomas de ovario (61)).

Este tipo de antígenos se expresan en mayor medida en las células cancerosas, haciendo que estos antígenos asociados a tumor sean una diana atractiva para el empleo de anticuerpos específicos antitumorales, así como su empleo como marcadores diagnósticos.

2.1.6. Antígenos de diferenciación específicos de tejidos

Aquellas moléculas que sólo se expresan en las células de origen de los tumores, pero no en el resto de tejidos se denominan antígenos de diferenciación, ya que son específicos de un linaje celular en particular o bien de un estado de diferenciación concreto de varios tipos celulares. Puesto que son moléculas propias normales, ya que se expresan también en tejidos sanos, no inducen mucha inmunogenicidad.

Estos antígenos sirven para identificar el origen tumoral, así como para ser usados como dianas terapéuticas mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, como por ejemplo rituximab (anti-CD20), el primer anticuerpo monoclonal utilizado en oncología administrado eficazmente para el tratamiento de linfoma B no Hodgkin y otros linfomas de estirpe B (62); o los marcadores de diferenciación melanocito-melanoma, como la proteína MART-1/Melan-A, utilizada en la inmunoterapia de melanoma (63).

2.2. Mecanismos efectores (respuesta inmunitaria frente a los tumores)

Todos estos antígenos tumorales son procesados y presentados por moléculas de HLA en la superficie de las propias células tumorales o bien por parte de las células presentadoras de antígenos. Una vez en la superficie, éstos son reconocidos por los linfocitos T a través de sus receptores de membrana (TCR, *T cell receptor*), que interaccionan con las moléculas de HLA que contienen los péptidos tumorales y, con la ayuda de moléculas coestimuladoras, producen la activación y expansión clonal de los linfocitos T específicos para esos antígenos tumorales reconocidos (**figura I2**). Los CD4 reconocen los antígenos tumorales asociados a moléculas HLA de clase II y los CD8 a moléculas HLA de clase I. A pesar de que una elevada infiltración de

linfocitos CD8 en el tumor se asocia a un mejor pronóstico en diversos cánceres, ya que éstos son capaces de destruir directamente a las células tumorales, también se ha visto como los linfocitos CD4 juegan un papel muy importante en respuesta inmunitaria antitumoral, mediante la secreción de diversas citocinas que estimulan a los linfocitos T citotóxicos.

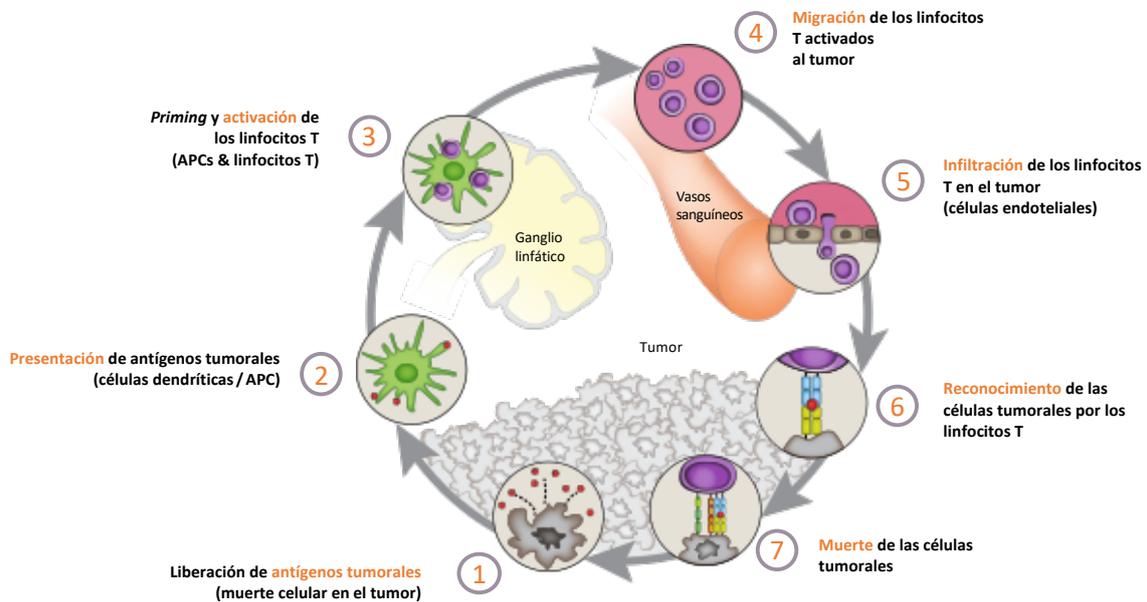


Figura 12. Respuesta inmunitaria frente a tumores: ciclo inmunidad-cáncer. La generación de una respuesta inmune frente al cáncer es un proceso cíclico que da lugar a la generación de factores tanto estimulantes como inhibidores del sistema inmune. Se divide esquemáticamente en 7 procesos principales, desde la liberación de antígenos tumorales hasta la destrucción de las células tumorales. En la figura se describen los distintos procesos, con las principales células implicadas en cada uno de ellos. Adaptado de (64).

2.2.1. Linfocitos T

Los linfocitos T citotóxicos CD8 constituyen el principal mecanismo antitumoral de nuestro sistema inmunitario. Estas células son capaces de detectar y eliminar células malignas que expresen antígenos adecuados asociados a moléculas del MHC.

Su presencia es tan importante que la detección de infiltrados de este tipo de células en el tejido tumoral se asocia con un mejor pronóstico en la mayoría de tumores.

Para poder estimular a estas células CD8, los antígenos tumorales deben ser reconocidos a través de moléculas del MHC de clase I, sin embargo, cuando las células presentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cells*) captan estos antígenos tumorales, puesto que son exógenos, los presentan a través del MHC de clase II a los linfocitos CD4. Para poder desencadenar la respuesta inmunitaria más eficaz, estimulando a los CD8, también tiene lugar

la llamada “cross-presentación” o presentación cruzada, mediante la cual los péptidos tumorales son captados y procesados por las APCs quienes, a través de sus moléculas del MHC de clase I y la expresión de moléculas coestimuladoras, son capaces de estimular a los linfocitos T CD8 (**figura 13**) (65). Este proceso de presentación cruzada es clave para desencadenar una respuesta inmune antitumoral más potente.

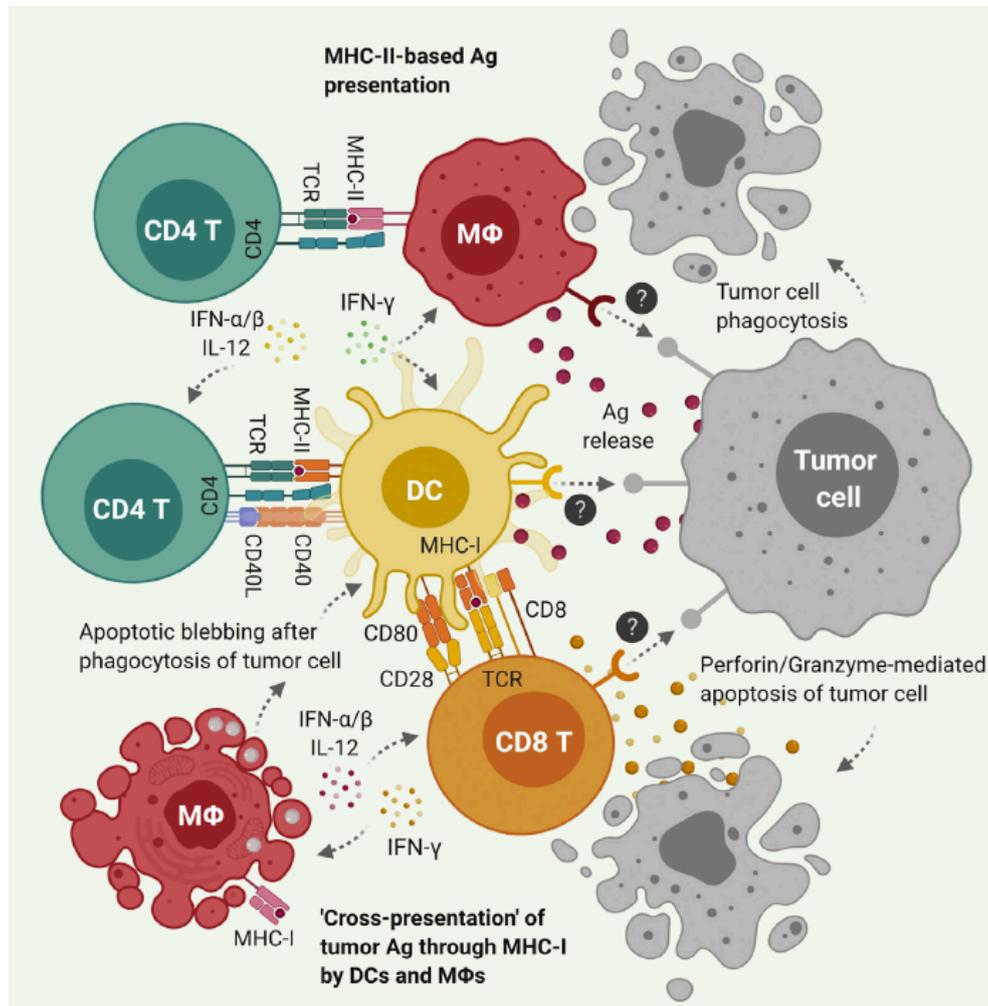


Figura 13. Presentación cruzada de antígenos tumorales. Además de la presentación antigénica a los CD4 por parte del MHC-II de APCs, los linfocitos CD8 también pueden ser activados por esta vía a través de presentación cruzada (*cross-presentation*) de antígenos tumorales en el MHC-I de las APCs, que pueden captar estos antígenos mediante fagocitosis de restos tumorales. Estos CD8 activados pueden inducir la apoptosis tumoral por la vía de granzima/perforina. Adaptado de (66). DC (célula dendrítica), MΦ (macrófago).

Los linfocitos T cooperadores CD4 también son importantes en la inmunidad antitumoral. Éstos liberan citocinas que favorecen la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos, y otras como el TNFα o el IFNγ, que aumentan la expresión del MHC clase I y activan a los macrófagos, entre otros.

2.2.2. Anticuerpos

El sistema inmunitario también puede sintetizar anticuerpos contra los antígenos tumorales anteriormente descritos. Estos anticuerpos lograrán la destrucción de las células tumorales mediante la activación del complemento o a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mediada por macrófagos y células NK.

A pesar de haber demostrado capacidad antitumoral para destruir células tumorales *in vitro*, los datos de eficacia de respuesta inmunitaria humoral en pacientes con cáncer son muy limitados.

2.2.3. Células NK

Las células tumorales que expresan ligandos para receptores activadores y bajos niveles de MHC clase I son susceptibles de ser eliminadas por las células NK. Algunos tumores, debido a la presión ejercida por los linfocitos T citotóxicos, pierden su expresión de MHC de clase I, lo que las convierte en una diana para las NK. Además, algunos tumores expresan MIC-A o MIC-B, ligandos del receptor activador NKG2D de las NK.

La capacidad citotóxica de estas células NK puede verse aumentada con la presencia de ciertas citocinas como IFN- γ , IL-15 o IL-12. Además, las células NK activados por la IL-2, llamados linfocitos citolíticos activados por citocinas (LAK, *lymphokine-activated killer*), tienen una potencia citolítica mayor que las propias NK, lo cual las hace atractivas como candidatas a ser usadas como inmunoterapia antitumoral.

2.2.4. Macrófagos

En función del fenotipo que presenten los macrófagos, estos pueden inhibir o promover el crecimiento de los tumores. Se identifican los macrófagos de tipo M1, activados a través del reconocimiento de patrones asociados a daños celulares por sus TLR o mediante el INF- γ , son capaces de eliminar las células tumorales mediante los mismos mecanismos que utilizan para eliminar microorganismos infecciosos, como la producción de óxido nítrico. Por otro lado, los macrófagos de tipo M2, que son activados de manera alternativa, secretan VEGF, TGF β y otros factores solubles que promueven la angiogénesis y la progresión tumoral.

2.3. Mecanismos de evasión tumoral

A pesar de todos los mecanismos anteriormente descritos con los que cuenta nuestro sistema inmunitario para luchar contra los tumores, en ocasiones estos no son suficientes para impedir el desarrollo del cáncer.

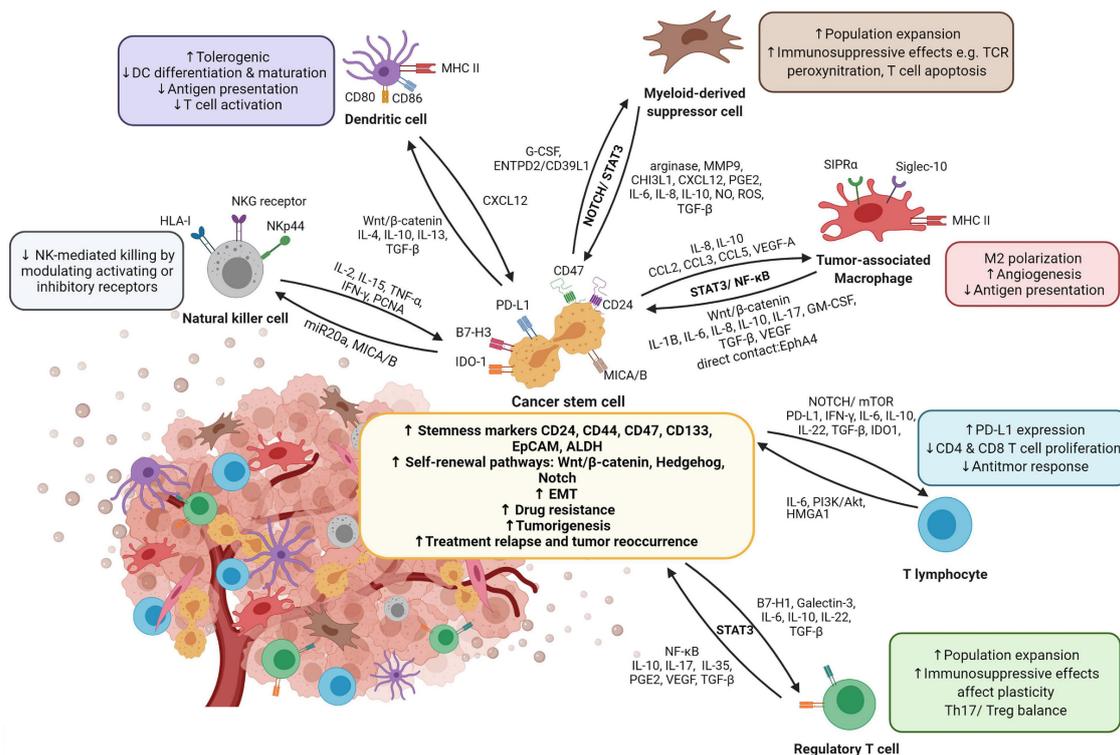


Figura 14. Mecanismos de evasión tumoral. En el microambiente tumoral se producen interacciones entre los distintos elementos celulares (APCs, NKs, Treg, etc) y solubles (citocinas o quimiocinas) que pueden favorecer el crecimiento de las células tumorales a pesar de la acción del sistema inmune. Adaptado de (67).

Esto es debido a que existen otros procesos, algunos intrínsecos a las células tumorales y otros mediados por las propias células del sistema inmunitario, contrarios a dichos mecanismos efectores, que hacen posible que el tumor acabe evadiendo la respuesta inmunitaria antitumoral (**figura 14**).

Debido a la inmunovigilancia ejercida sobre el tumor se produce una selección de las variantes tumorales menos inmunogénicas que conducen finalmente al crecimiento incontrolado del tumor.

Es importante comprender estos mecanismos de evasión inmunitaria de los tumores, ya que ello nos permitirá encontrar los puntos débiles donde intervenir y potenciar nuestro sistema inmunitario que se traducirá, en última instancia, en la erradicación del tumor. A continuación, se describen las principales estrategias de escape tumoral.

2.3.1. Pérdida de la expresión de antígenos tumorales

Recuperando el concepto de la inmunoección tumoral antes mencionado (30), la presión ejercida por el sistema inmunitario sobre las células tumorales hace que éstas, gracias a las mutaciones sufridas durante su proliferación, seleccionen aquellas variantes menos

inmunogénicas que, por lo tanto, tendrán menos probabilidades de ser reconocidas por el sistema inmunitario y podrán sobrevivir. Esta teoría se ha demostrado en diversos experimentos llevados a cabo en ratones. En ellos, se inducían tumores a ratones inmunodeficientes y a ratones sanos, para posteriormente trasplantar dichos tumores a otros ratones sanos y comprobar que el tumor se reproducía con más frecuencia cuando provenía de ratones sanos, debido a que las células tumorales ya habían estado sometidas a la presión del sistema inmunitario y se habían vuelto menos inmunogénicas y más difíciles de eliminar por parte de otro sistema inmunitario. Esta presión no existía cuando el tumor provenía de ratones inmunodeficientes, con lo que el ratón sano podía detectar más fácilmente las células tumorales inmunogénicas (figura 15).

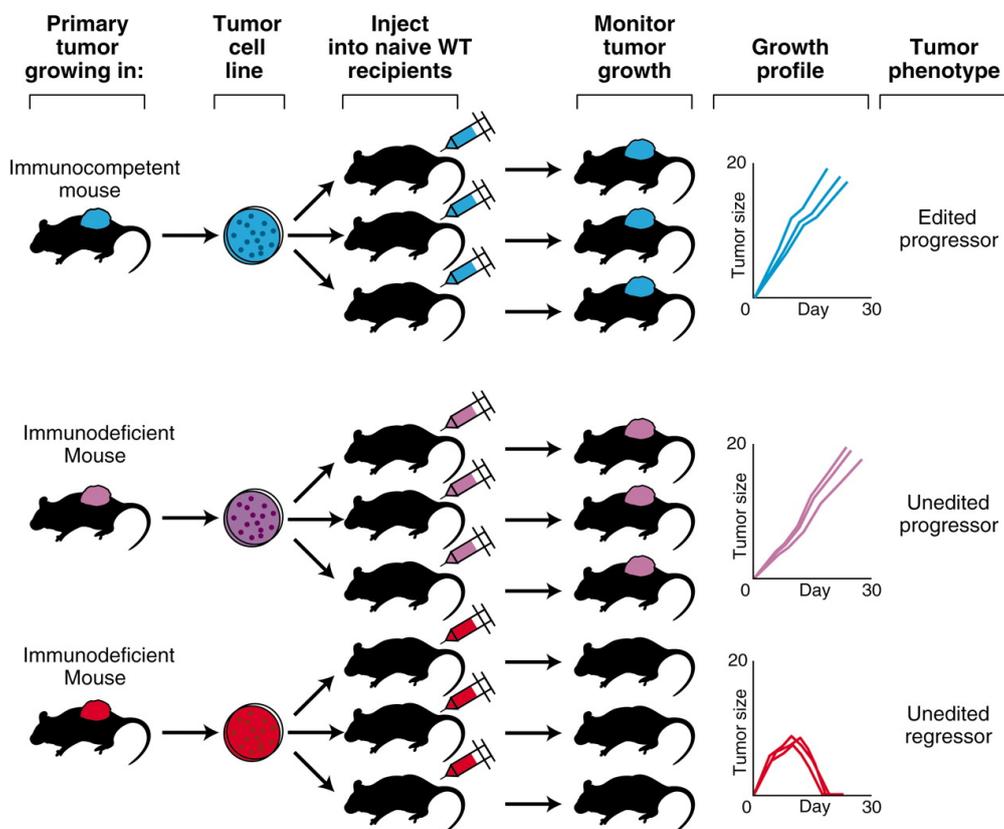


Figura 15. Inmunoección tumoral. Demostración de esta teoría con experimentos de trasplantes tumorales en ratones: los ratones que recibieron tumores provenientes de ratones inmunocompetentes (en azul) desarrollaron en su mayoría el tumor. Sin embargo, en los ratones que recibieron tumores de ratones inmunodeficientes sólo una parte desarrolló el tumor (en violeta) mientras que otra parte pudo eliminarlo (en rojo), gracias a que las células tumorales proveían de un entorno con poca presión inmunitaria y eran más inmunogénicas. Adaptado de (26).

Uno de las estrategias que utilizan las células tumorales para ser menos inmunogénicas es la **disminución o pérdida de la expresión de los antígenos tumorales**. A medida que las células

tumorales van acumulando mutaciones, pueden perder genes que codifiquen los antígenos tumorales que son reconocidos por el sistema inmunitario. Si pierden antígenos que no son necesarios para su crecimiento ni su fenotipo, estas células podrán sobrevivir con mayor probabilidad.

Otro de los mecanismos empleados por los tumores para evadir al sistema inmunitario es la **alteración en la expresión de moléculas MHC**, gracias a lo cual mantendrán sus antígenos tumorales, pero éstos serán invisibles para el sistema inmunitario. Las células tumorales son capaces de inhibir la expresión de la clase I del MHC, de manera que los linfocitos no podrán reconocer los antígenos. Sin embargo, esta pérdida de MHC clase I hará que se estimulen las células NK. Este defecto de expresión se ha observado en diversos tumores (68,69), y afectan generalmente a la β_2 -microglobulina o a los componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico, como el transportador asociado al procesamiento de antígenos y algunas subunidades del proteasoma. Estas alteraciones darán lugar a fenotipos de MHC alterados, ya sea con pérdida alélica, de locus o de haplotipo (**figura I6**).

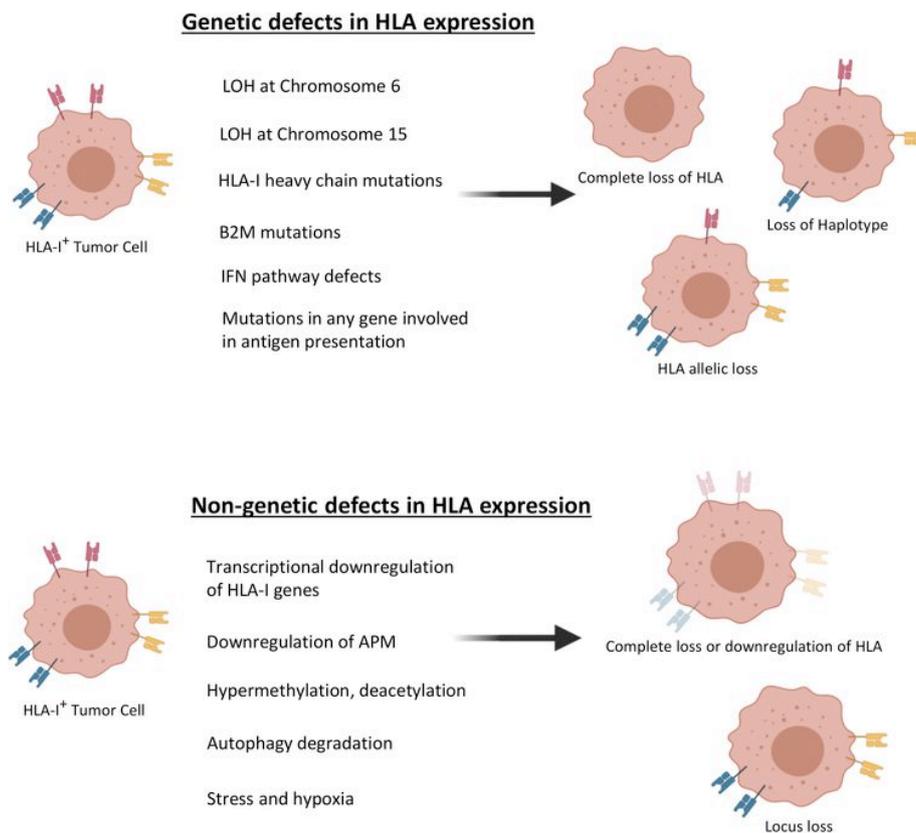


Figura I6. Alteraciones en la expresión de moléculas HLA clase I en células tumorales. Estas alteraciones pueden producirse debido a defectos tanto genéticos como no-genéticos (esquematisados en la imagen) y pueden dar lugar a: pérdida completa o disminución en la expresión del HLA, pérdida de un haplotipo, pérdida de uno o varios alelos. Adaptado de (70).

Las alteraciones en la expresión de las moléculas de MHC harán que, aunque existan los antígenos tumorales, estos no puedan ser presentados a los linfocitos T que por lo tanto no podrán reconocerlos.

2.3.2. Inhibición activa de la respuesta inmunitaria

Uno de los mecanismos frecuentemente utilizados por los tumores es el aumento de expresión de diversas moléculas de superficie capaces de inhibir a los linfocitos T. Este **aumento de moléculas inhibitorias**, denominadas puntos de control inmunológico o *checkpoints*, en condiciones normales es utilizado por células sanas para mantener la tolerancia de los linfocitos T y evitar una excesiva estimulación de los mismos, para no desencadenar una respuesta autoinmunitaria. Una de las moléculas inhibitorias más representativas que expresan los tumores es PDL-1, que al unirse a su ligando PD-1 en los linfocitos T afecta a su supervivencia y producción de citocinas. PD-L1, junto con CTLA-4, también se expresa en las APCs, contribuyendo estas células presentadoras de antígeno a inhibir la activación de los linfocitos T. Utilizar anticuerpos monoclonales que bloquean estas vías inhibitorias es uno de los últimos logros en el campo de la inmunoterapia antitumoral, que se expondrá más adelante en el apartado 7.

Además del aumento de expresión de moléculas inhibitorias, las células tumorales también pueden **secretar diversos factores** que inhiben tanto la respuesta inmune adaptativa como la innata. Uno de los ejemplos más destacados es el TGF- β , que inhibe la proliferación, diferenciación y función efectora de linfocitos T (71), así como la expresión de receptores activadores NKG2D y NKp30 en NK (72), así como la función de los macrófagos (73). Otros factores solubles derivados del tumor implicados en la supresión de la respuesta inmunitaria son VEGF, IL-10, las ROS, IDO o PGE₂. Éstas pueden actuar directamente sobre los linfocitos o bien de forma indirecta mediante la transformación de APC hacia un fenotipo más tolerogénico, o favoreciendo la angiogénesis al aumentar la producción de metaloproteinasas de matriz como MMP2 y MMP9 (74).

Los **linfocitos T reguladores** (Treg) también juegan un papel clave en la promoción del crecimiento del tumor, ya que producen IL-10 y TGF- β (citocinas inmunosupresoras) y expresan moléculas inhibitorias como CTLA-4 y PD-1 (que inhiben a las APCs y favorecen su fenotipo tolerogénico). Todo contribuye a la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral y favorece un ambiente inmunosupresor (75).

Los **macrófagos** que se encuentran en el microambiente tumoral inmunosupresor (TAMs, *tumor associated macrophages*) tienen un fenotipo M2 que favorecen el crecimiento y la

invasividad de los tumores. Estos macrófagos, que secretan IL-10 y PGE₂, reducen la activación y funciones efectoras de los linfocitos T, favorecen la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo Th2, la angiogénesis e inhiben la función citotóxica de las NKs (76).

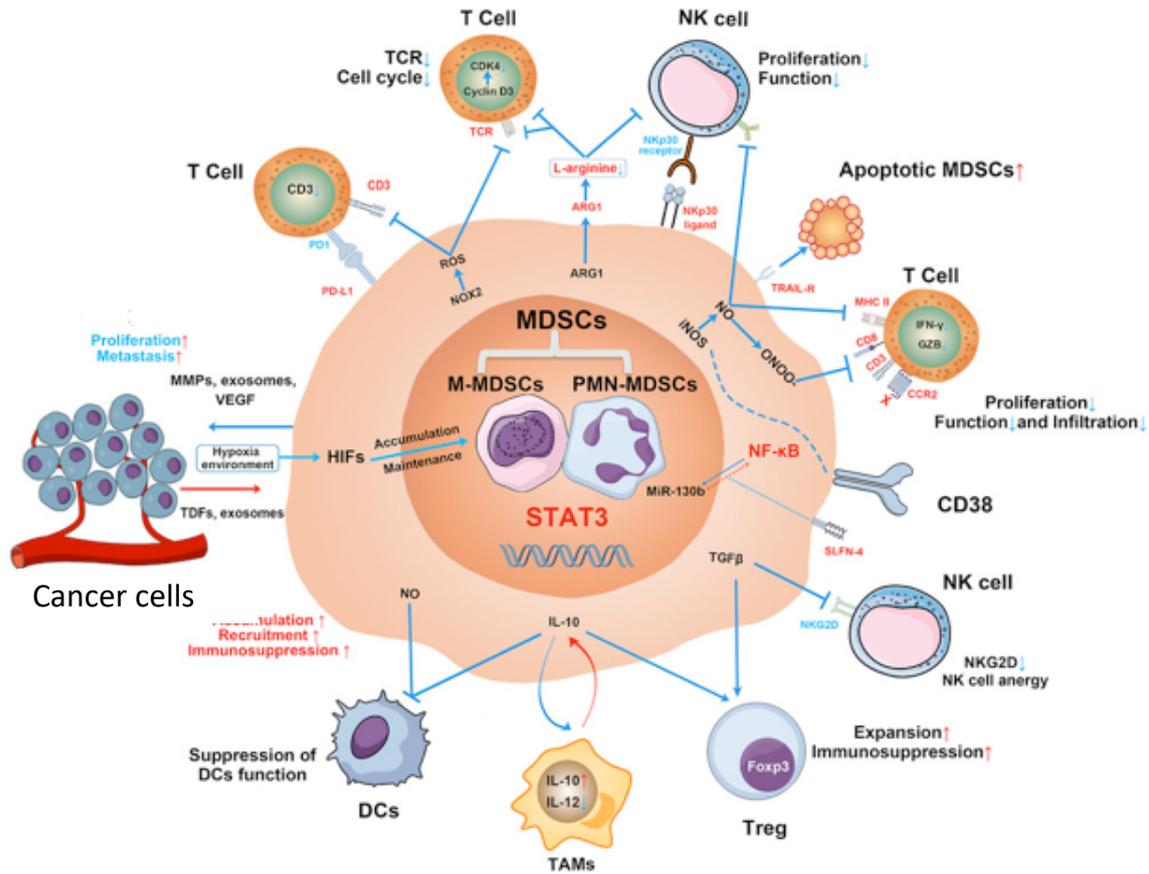


Figura 17. Mecanismos de inhibición de MDSC. M-MDSC, monocytic MDSCs; G-MDSC, granulocytic MDSCs; TDFs, tumor derived factors; MMPs, matrix metalloproteinases; VEGFs, vascular endothelial growth factors; HIFs, hypoxia-inducible factors; PD1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed death-ligand 1; TCR, T-cell receptor; CDK4, cyclin-dependent kinase 4; ARG1, arginase 1; NK cells, natural killer cells; NKP30, natural killer protein 30; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; ONOO-, peroxyntirite; MHC II, major histocompatibility complex class 2; CCR2, C-C motif chemokine receptor 2; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; MiR-130b, microRNA 130b; SLFN4, Schlafen4; TGFβ, transforming growth factor β; NKG2D, natural killer group 2 member D; Foxp3, forkhead box P3; Treg, regulatory T-cell; IL-10, interleukin 10; IL-12, interleukin 12; TAMs, tumor associated macrophages; DCs, dendritic cells; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3. Adaptado de (77).

Las **células supresoras mielocíticas** (MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*) son un grupo heterogéneo de precursores mielocíticos inmaduros (mayoritariamente granulocitos, macrófagos y DCs), definidos comúnmente como CD11b+CD33+, que se acumulan en los tejidos linfáticos, sangre o tumores, suprimiendo la respuesta inmune innata y adaptativa (78).

Diversos mediadores proinflamatorios producidos por las células tumorales, como VEGF, IL-6 o PGE₂, reclutan estas células desde la médula ósea al resto de tejidos. Una vez en el microambiente tumoral, las MDSC liberan factores inmunosupresores como IL-10 o TGF β , que junto con la elevada expresión de arginasa (que favorece la depleción de arginina) y óxido nítrico sintasa inducible (que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno) inhiben la función inflamatoria de macrófagos, DCs y NKs, dificultan la activación de los linfocitos T y favorecen el desarrollo de linfocitos Treg y Th2 (79). Todo esto contribuye a crear un ambiente inmunosupresor en el tumor, dificultando la eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmunitario (**figura 17**).

Otro de los mecanismos que pueden favorecer la evasión tumoral es la **disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras**. Si los linfocitos T no reciben señales estimulantes suficientes, entran en un estado de anergia. En distintos tumores se ha visto una disminución de moléculas de la familia B7 en las células tumorales que se traduce en un descenso de la expresión de la cadena CD3z de los linfocitos T y de los ligandos activadores de las NK como NKG2D o NKp30 (80–82). Además, también se ha descrito un aumento de la expresión de Fas-L, que al interactuar con su receptor Fas en los linfocitos T, inducen la apoptosis de los mismos. Algunas células tumorales también adquieren cambios genéticos que les permiten modular la expresión de receptores pro- y anti-apoptóticos (Bcl-2 o Fas), lo cual incrementa la resistencia de estas células a la apoptosis mediada por receptores de muerte (80).

2.3.3. Papel del sistema inmunitario en la promoción del crecimiento tumoral

Pese al papel indispensable que juega el sistema inmunitario en la erradicación de los tumores, también se ha visto que el mismo puede contribuir al desarrollo de algunos tumores sólidos.

La **inflamación crónica** es un factor de riesgo importante en el desarrollo de diversos tumores, como es el caso de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. También los tumores asociados a infecciones se han relacionado como consecuencia indirecta de la inflamación sostenida producida como respuesta a los microorganismos infecciosos. Un ejemplo sería el carcinoma gástrico debido a la infección crónica por *Helicobacter pylori* o los carcinomas hepáticos desarrollados tras infecciones crónicas de VHB y VHC. Los mecanismos moleculares mediante los cuales estas infecciones crónicas favorecen el desarrollo tumoral no se conocen en profundidad, pero esta asociación se ha demostrado en diversos modelos de animales.

La **respuesta inmunitaria innata** es la principal responsable de la promoción tumoral. Diversas células, principalmente macrófagos de tipo M2, liberan factores que favorecen la

angiogénesis y modifican el tejido extracelular, como el **VEGF y MMP-9**, respectivamente. Esta angiogénesis y reestructuración tisular que ocurren durante la inflamación crónica favorecen el crecimiento y diseminación tumoral. Otros factores del sistema inmune innato que favorecen la transformación neoplásica y el desarrollo de tumores son la producción de radicales libres (que induce mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores), factores solubles secretados por granulocitos que favorecen la supervivencia de las células tumorales o la activación de la vía NF-kB. Los linfocitos B secretan factores que regulan la proliferación tumoral y los linfocitos T pueden activar macrófagos durante una infección persistente, por lo que el sistema inmune adaptativo también puede desempeñar un papel relevante en la progresión de los tumores, ya que pueden promover la activación de las células del sistema inmune innato.

El desafío para los inmunólogos es conseguir un equilibrio entre una respuesta inmunitaria potente capaz de contener al tumor, pero sin provocar reacciones inflamatorias prolongadas que acaben promoviendo el crecimiento tumoral.

3. Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son las células **presentadoras de antígenos** más potentes que se conocen. Desempeñan un papel muy importante en la activación de los linfocitos T inmaduros (*naïve*) suponiendo un nexo de unión entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos linfáticos, epitelio mucoso y el parénquima de los órganos. En cuanto a su origen, la mayoría provienen de un precursor mielóide de células hematopoyéticas que puede diferenciarse en monocitos, pero no en granulocitos, aunque algunas también pueden derivar de precursores embrionarios y de monocitos, y dependen del ligando de Flt3, que se une a su receptor tirosin cinasa Flt3, para poder llevar a cabo su maduración. Además de su papel en el **sistema inmunitario adaptativo**, también juegan un papel relevante en las **respuestas inmunitarias innatas frente a infecciones**, ya que poseen receptores que reconocen patrones y moléculas producidas por microbios y en respuesta producen citocinas, de manera análoga a los que hacen los macrófagos.

Las células dendríticas **clásicas** (o tradicionales), que se encuentran en piel, mucosas y parénquima de los órganos, migran a los ganglios linfáticos cuando reconocen microbios, donde presentarán los antígenos microbianos a los linfocitos T.

Existe una subpoblación de células dendríticas, llamadas células dendríticas **foliculares**, que juegan un papel importante en las infecciones víricas mediante su pronta respuesta. Reconocen ácidos nucleicos de los virus intracelulares y producen interferones de tipo I, con potentes actividades antivíricas.

En cuanto a su papel en la inmunidad innata, estas células realizan una función esencial en el **reconocimiento de patógenos**, al ser las células que expresan más tipos diferentes de **TLR** y otros receptores de reconocimiento de patrones lo que las convierte en los detectores de **PAMP** y **DAMP** más versátiles de nuestro sistema inmunitario.

Gracias a esta capacidad de respuesta innata contra los microbios, las células dendríticas son capaces de desencadenar con gran eficacia la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T. Esto se debe a la capacidad de las células dendríticas de captar antígenos microbianos, migrar con ellos hacia los ganglios linfáticos para presentarlos allí a los linfocitos T de manera que puedan reconocerlos adecuadamente, activarse y diferenciarse en linfocitos T efectores gracias a la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas por parte de las células dendríticas. En función del tipo de microbio reconocido por las células dendríticas, éstas dirigirán la diferenciación de los linfocitos T *naïve* a linfocitos Th1 o Th17.

3.1. Subtipos de células dendríticas

Las células dendríticas están en la mayoría de tejidos y abundan en los órganos linfáticos, la piel y los tubos digestivo y respiratorio. La mayoría derivan de precursores mieloides del adulto, excepto las células de Langerhans de la piel, que se desarrollan a partir de precursores embrionarios.

Los diferentes subtipos de células dendríticas se han definido en función de su fenotipo, perfil de transcripción, ontogenia y funciones. En función de su linaje, existen 2 poblaciones principales de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides), además de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs). Veremos con más detalle los diferentes subtipos de DCs en los siguientes apartados.

3.1.1. Células dendríticas clásicas

Estas células, también llamadas células dendríticas mieloides, tradicionales o convencionales (cDCs), son el subgrupo más numeroso en los órganos linfáticos. La mayoría deriva de precursores mielocíticos, que se diferencian en células dendríticas en los tejidos linfáticos y no linfáticos. En los tejidos en los que residen se encuentran constantemente tomando muestras del ambiente, ya sea intestino, piel, etc.

Al capturar antígenos, estas células migran a los ganglios linfáticos para presentárselos a los linfocitos T. Si se han encontrado en un ambiente inflamatorio o con microbios, las células dendríticas además producirán citocinas y aumentarán la expresión de moléculas coestimuladoras, donde iniciarán la respuesta inmunitaria de los linfocitos T. Sin embargo, si no existe un proceso inflamatorio o infeccioso, cuando las células dendríticas captan los antígenos no producirán citocinas ni expresarán moléculas de coestimulación, con lo que no estimularán a los linfocitos T. Esto último es útil para detectar linfocitos T autorreactivos o generar linfocitos T reguladores, de gran importancia para evitar mecanismos autoinmunitarios.

Este tipo de células puede dividirse, a su vez, en otros 2 subgrupos:

3.1.1.1. cDC1

Identificadas como BDCA-1+CD1c+. Son las células dendríticas más efectivas para estimular respuestas de linfocitos T citotóxicos *in vivo*, mediante la presentación cruzada en la cual las cDC1 captan antígenos exógenos y se los presentan a los linfocitos T CD8+ a través de moléculas MHC de clase I. Esto las convierte en células clave en la regulación de la inmunoterapia del cáncer.

Además de la presentación cruzada, estas células también pueden regular la respuesta inmunitaria innata a través de otros mecanismos siendo especialistas en la generación de respuestas inmunitarias de tipo Th1. Son las únicas que expresan TLR11 (83), que reconoce un antígeno de *Toxoplasma gondii*, siendo la fuente de IL-12 para luchar de manera aguda contra la infección de *T.gondii*. La IL-12 producida por cDC1 también estimula la producción de INF- γ por parte de las células NK (84), aunque diversos estudios han observado que las cDC1 producen menores niveles de IL-12 que cDC2, al contrario que en los modelos murinos (85).

También se ha visto que las cDC1 expresan TLR3 (83), que al reconocer patrones como RNA de doble cadena induce la maduración de cDC1 y promueve respuestas antivirales y antitumorales (86,87).

3.1.1.2. cDC2

Identificadas como BDCA-3/CD141+. (CD88-CD1c+CD2+CD163). Se asocian a la activación de los linfocitos T CD4+ (88).

Numerosos estudios han revelado la importancia de este subtipo de células dendríticas en la regulación de las respuestas inmunitarias de tipo II contra alérgenos y parásitos (89,90), las

respuestas inmunitarias de tipo III contra patógenos extracelulares y la microbiota intestinal (91) y las respuestas inmunitarias humorales contra antígenos en la vía sanguínea (92,93).

En algunos estudios también se diferencian 2 subtipos de cDC2 en función de la expresión de CD5, conocidas como cDC2A (CD5+) y cDC2B (CD5-) (94), aunque por el momento no se han aportado evidencias suficientes para determinar las bases genéticas de estos subtipos con fenotipo y funcionalidad diferentes.

Las cDC2 también pueden favorecer la diferenciación de los linfocitos T CD4 naive hacia linfocitos T colaboradores foliculares, mediante la estimulación directa y la producción de citocinas que favorecen este fenotipo, como TGF- β (95).

Dentro de este grupo también se encontrarían las **cDC3**, definidas por el fenotipo de CD88-CD1c+CD2+CD163+ (expresando o no CD14, que tradicionalmente se asociaba como un marcador de monocitos), de reciente descripción (96), que se caracterizan por la expresión de CDc1+CD14+, provienen de progenitores de granulocitos-monocitos y células dendríticas (GMDF) (97) y su función principal es, además de estimular a los linfocitos T naive como el resto de cDC2 (98), promover la diferenciación hacia Th17 (99) e inducir la expresión de CD103 en los linfocitos T (98), un marcador de linfocitos residentes en tejidos.

3.1.2. Células dendríticas plasmacitoides

Estas células, definidas como HLA-DR+CD45RA+CD123+CD303+, tras activarse adquieren la forma de células plasmáticas, de ahí el nombre de células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Se localizan principalmente en sangre periférica (donde representan el 1% de las células mononucleares y el 50% de las células dendríticas) (100) y en menor medida en órganos linfáticos. Proviene de un precursor común de la médula ósea que también da lugar a las cDCs (31). En sangre periférica, En cuanto a sus funciones, tienen poca capacidad fagocítica, ya que su función principal es actuar en infecciones víricas secretando grandes cantidades de interferones tipo I (α y β), aunque en estos casos también presentan antígenos a los linfocitos T específicos frente a los virus (85,101). También se ha visto que son capaces de generar una respuesta tolerogénica, induciendo la diferenciación de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+Foxp3+) (102) y linfocitos T productores de IL-10 (103).

La capacidad de este tipo de células de responder rápidamente a infecciones víricas se debe a su elevada expresión de TLR7 y TLR9, capaces de reconocer ARN viral y dinucleótidos CpG, respectivamente (104,105). Además, diversos estudios han demostrado la capacidad de las pDCs de controlar las infecciones virales gracias a la regulación que ejercen sobre otras

poblaciones celulares, como células NKs o linfocitos T citotóxicos (CTL), así como la maduración que inducen sobre las cDC1 gracias a la liberación de interferón tipo I (106–108).

A pesar de haber demostrado que pueden llevar a cabo la presentación cruzada de antígenos a los linfocitos T CD8+ (109), se ha visto que las cDC1 tienen una capacidad mucho mayor de realizar esta presentación cruzada que las pDCs (110).

3.1.3. Células dendríticas derivadas de monocitos

En situaciones de inflamación, los monocitos pueden ser reclutados desde la sangre, a través del receptor para quimiocinas CCR2, para diferenciarse en células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) en los tejidos periféricos (111,112).

Estas células promueven la diferenciación celular de los linfocitos T CD4, en función del contexto, hacia una respuesta de tipo Th1, Th2 o Th17 (113).

Este tipo de células son muy relevantes en el campo de la inmunoterapia, ya que dentro de esta categoría también se engloban las células dendríticas obtenidas *in vitro* utilizadas para la elaboración de vacunas. El método se describió por primera vez en la década de los 90: a partir de los monocitos de sangre periférica, éstos son cultivados con IL-4 y GM-CSF y dan lugar a células dendríticas inmaduras (114,115), que posteriormente, en función de los estímulos utilizados, podrán diferenciarse hacia células dendríticas maduras inmunogénicas o tolerogénicas, capaces de presentar antígenos (116) y estimular a los linfocitos T (117).

3.2. Presentación de antígenos

Para poder iniciar una respuesta inmunitaria específica, los linfocitos deben ser capaces de reconocer los antígenos de manera adecuada. Existen muy pocos linfocitos T *naïve* específicos frente a un antígeno determinado, con lo que la probabilidad de que éstos puedan encontrar a su correspondiente antígeno, que puede encontrarse en cualquier parte del organismo, es muy baja. La solución de nuestro sistema inmunitario para luchar contra el azar es un sistema altamente especializado que hace aumentar exponencialmente las probabilidades de que un antígeno pueda ser reconocido por un linfocito T *naïve*. ¿Cómo? Pues mediante una red de células presentadoras de antígenos profesionales, principalmente células dendríticas, que se encuentran patrullando a lo largo de todo el organismo hasta encontrarse con algún elemento sospechoso. Una vez detectado, éste es captado y procesado por las células dendríticas y transportado hasta los ganglios linfáticos, los puntos de encuentro entre las células que capturan los antígenos (células dendríticas) y las células encargadas de eliminar a estos elementos sospechosos (los linfocitos T). De esta manera, los ganglios linfáticos actúan como

filtros recogiendo los antígenos antes de que lleguen a la sangre, y los que llegan al torrente circulatorio son captados por el bazo. Una vez establecido este encuentro, se produce la esperada sinapsis inmunológica, en la cual la célula dendrítica no sólo presentará el antígeno en cuestión al linfocito T (a través del reconocimiento MHC - TCR), si no que también establecerá uniones entre distintas moléculas coestimuladoras y sus ligandos correspondientes en el linfocito T. Esta sinapsis iniciará una respuesta que conducirá a la activación del linfocito T *naïve* y su diferenciación a linfocito T efector, de diferente subtipo en función de las señales que ha recibido de la célula dendrítica, que dependerán a su vez de la naturaleza del agente sospechoso reconocido inicialmente y de los mediadores que se encuentren en el ambiente.

3.2.1. Captura del antígeno

En diversos experimentos realizados en ratones, se vio que al inyectarles antígenos estos no se asociaban a los linfocitos T, si no que lo hacían a otras células, principalmente macrófagos y células dendríticas y que la capacidad inmunogénica de estos antígenos era mucho mayor cuando estaban unidas a estas células que cuando se encontraban de forma soluble. Además, otros experimentos *in vitro*, demostraron que los linfocitos T aislados no eran capaces de responder a los antígenos, si no que necesitaban de la colaboración de otras células. Todos estos experimentos llevaron a la conclusión de que los linfocitos T necesitaban que les presentasen los antígenos para poder reconocerlos, y de ahí surgió el nombre de células presentadoras de antígenos.

Las células dendríticas son las APCs más eficaces a la hora de iniciar la respuesta inmune adaptativa, ya que son las únicas APCs cuya función principal es la de capturar y presentar antígenos y las únicas capaces de iniciar las respuestas primarias de linfocitos T, activando a los linfocitos T *naïve*, mientras que otras APCs, como macrófagos y linfocitos B, estimulan linfocitos T previamente activados.

Además de presentar los antígenos a través del MHC, las células dendríticas proporcionan los estímulos adicionales necesarios para obtener respuestas efectivas de los linfocitos T, conocidos como “segundas señales”. Estos estímulos los realizan mediante unas moléculas unidas a su membrana, denominadas moléculas coestimuladoras (CD80 o CD86), que interactúan con el ligando correspondiente en la superficie de los linfocitos T (principalmente CD28), así como mediante la liberación de citocinas que favorecen la diferenciación de los linfocitos T (**figura 18**).

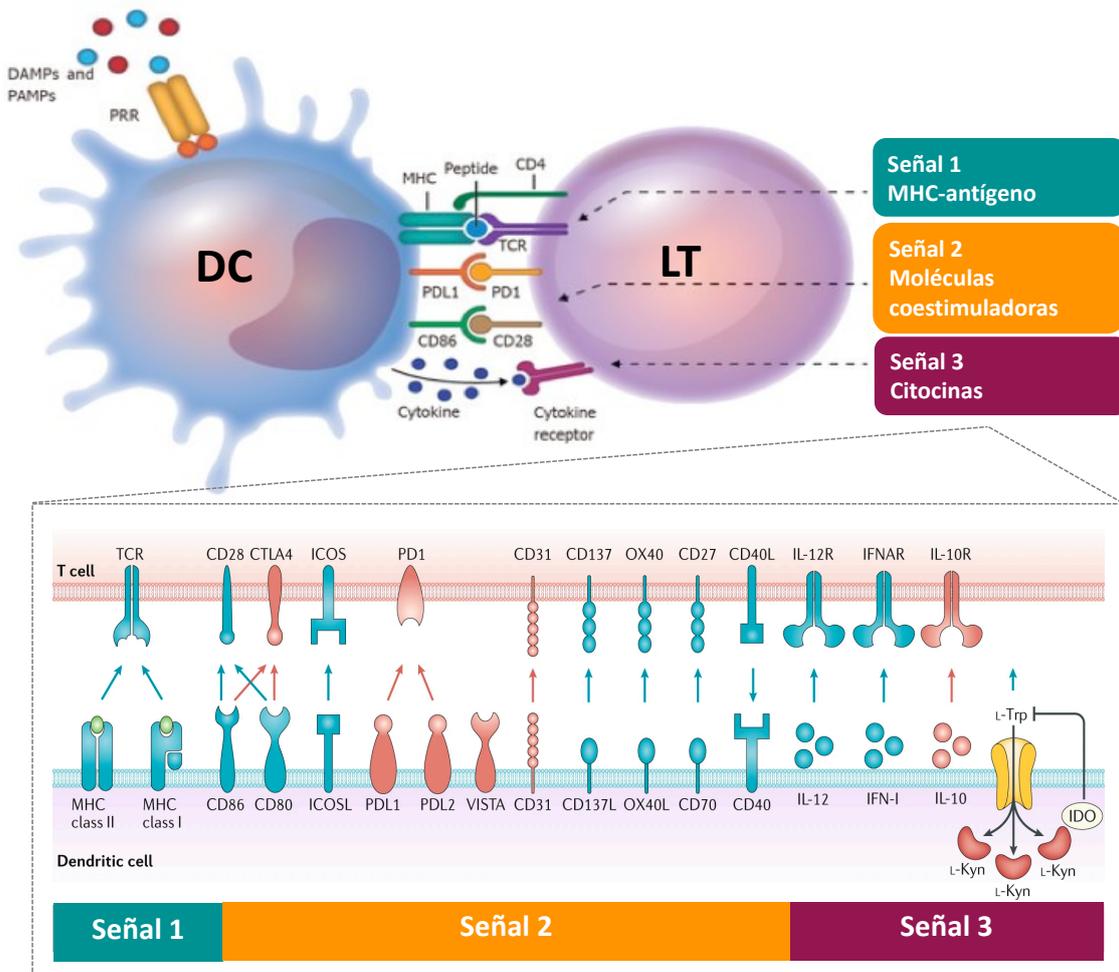


Figura 18. Interacción del complejo MHC-péptido de la DC con el TCR del LT. Durante la presentación del antígeno (señal 1), se producen interacciones adicionales entre la DC y el LT, a través de moléculas coestimuladoras (señal 2) y la interacción de citocinas liberadas por la DC con los receptores del LT (señal 3). DC: célula dendrítica; LT: linfocito T; DAMPs: *Damage-associated molecular patterns*; PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*; PD1: *Programmed death-1*; PDL1: *Programmed death ligand 1*; PRR: *Pattern recognition receptor*. Adaptado de (118,119).

Las propias sustancias microbianas que reconocen afectan a la función de las células dendríticas, ya que éstas poseen TLRs que, al detectar microbios, aumentan la expresión de moléculas MHC y coestimuladoras en las células dendríticas, que aumentarán la eficacia a la hora de estimular a los linfocitos T, y también favorecen la expresión receptores de quimiocinas, lo cual favorecerá la migración de las células dendríticas hasta donde se localicen los linfocitos T. Esto explica la necesidad de usar adyuvantes para inducir una respuesta inmunitaria óptima, de ahí que se utilicen productos microbianos en experimentos para potenciar todas las funciones presentadoras de las células dendríticas.

Además de las señales recibidas por los microbios, las células dendríticas también reciben señales de los linfocitos T, principalmente la expresión de CD40L y la secreción de IFN- γ , que interactuarán con el CD40 y otros receptores de las células dendríticas para aumentar su capacidad de procesamiento y presentación antigénica.

Las células dendríticas usan diversos receptores de membranas para capturar e interiorizar los antígenos microbianos, mediante endocitosis y fagocitosis. Además de estos mecanismos mediados por receptores, las células dendríticas también pueden ingerir antígenos por otros procesos que no implican receptores de reconocimiento específicos, como micropinocitosis y macropinocitosis, que consisten en la captura de cualquier cosa que esté en la fase líquida del entorno de la célula dendrítica.

3.2.2. Transporte del antígeno

Una vez capturado el antígeno, las células dendríticas lo transportan a los ganglios linfáticos. Los productos microbianos interiorizados por las células dendríticas son reconocidos por diversos receptores de reconocimiento de patrones, principalmente los TLR. Esta interacción, junto con las señales recibidas por citocinas como el TNF, hacen que las células dendríticas se activen, pasando de un estado inmaduro a un fenotipo maduro, disminuyendo su adhesión al endotelio y aumentando la expresión de receptores de quimiocinas, principalmente CCR7. Este receptor interactúa con las quimiocinas CCL19 y CCL21, que se encuentran en los vasos linfáticos y en las zonas de los ganglios linfáticos donde se encuentran los linfocitos T, favoreciendo la migración de los linfocitos T hacia allí. Los linfocitos T *naïve* también expresan CCR7, de manera que migrarán a las mismas zonas que las células dendríticas y se producirán el encuentro entre estos dos tipos celulares, aumentando las posibilidades de que un linfocito T *naïve* encuentre un antígeno que pueda reconocer.

Los antígenos también pueden transportarse a los ganglios linfáticos en forma soluble, ya que las células dendríticas residentes en bazo y ganglios linfáticos pueden capturar antígenos que llegan a través de la sangre y la linfa, y presentárselos a los linfocitos T que se encuentran en los ganglios.

3.2.3. Presentación del antígeno

Las células dendríticas maduras también sufren cambios que aumentan su capacidad de estimular a los linfocitos T, como el incremento de la expresión de moléculas del MHC con los péptidos unidos y de moléculas coestimuladoras.

Estas células poseen varias propiedades que las convierten en las APCs más eficientes a la hora de iniciar las respuestas de los linfocitos T:

- Su localización está en los lugares de entrada frecuentes de microbios y antígenos extraños (p.e. mucosas), así como en tejidos fácilmente colonizables por microbios.
- Poseen receptores de reconocimiento de patrones que les permiten detectar una gran cantidad de microbios y responder ante ellos.
- Los receptores de quimiocinas que expresan hacen que migren desde las zonas de captura de antígenos hasta las zonas de los ganglios linfáticos donde se encuentran los linfocitos T *naïve*, ya que estos últimos también migran desde la circulación a las mismas regiones.
- Una vez maduras, expresan grandes cantidades de complejos MHC-péptido, moléculas coestimuladoras y citocinas, todas ellas necesarias para una activación adecuada de los linfocitos T *naïve*.
- Tienen la capacidad de llevar a cabo la presentación cruzada de antígenos, al lograr ingerir células infectadas por virus o células tumorales o sus fragmentos, llevar estas proteínas al citosol y presentarlas a los linfocitos T CD8+.

El reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T asegura que la respuesta inmunitaria sea específica para el antígeno en cuestión. Para llevar a cabo un reconocimiento adecuado de los antígenos, además de la unión del TCR al complejo péptido-MHC, también son necesarias moléculas de adhesión para estabilizar la interacción linfocito T-células dendrítica, correceptores que actúan junto con el TCR y moléculas coestimuladoras.

La familia de moléculas coestimuladoras mejor caracterizada es la de B7 (que comprende CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2)), expresadas en células dendríticas activadas, que se unen al receptor CD28, expresado de manera constitutiva en los linfocitos T. La expresión de estas moléculas está altamente regulada para asegurar que las respuestas del linfocito T se inicien sólo cuando sea necesario. Puesto que la expresión de los receptores de la familia B7 es muy baja cuando la célula dendrítica está en reposo (en estado inmadura), sólo cuando interaccione con algún estímulo que se una a sus receptores (principalmente los TLR) podrán unirse dichos receptores al CD28 del linfocito T y activarlo. Además, los linfocitos T CD4+ activados aumentan la expresión de coestimuladores B7 en las células dendríticas, a través de la interacción CD40L-CD40, con lo que se amplifican las respuestas del linfocito T iniciadas por las células dendríticas. Esto convierte a las células dendríticas en un nexo de unión en la inmunidad innata (al ser activadas por estímulos microbianos e inflamatorios) y la inmunidad adaptativa (al activar a los linfocitos T).

Estas moléculas coestimuladores no son sólo importantes para activar a los linfocitos T, si no que las células dendríticas también juegan un papel muy importante en la inducción o en el mantenimiento de la tolerancia. Esto es gracias a que, cuando las células dendríticas interactúan con tejidos normales y presentan antígenos propios, puesto que se encuentran en un estado inmaduro (debido a la falta de estímulos inflamatorios o microbianos), expresarán bajas cantidades de moléculas B7. Al presentarle estos antígenos propios a linfocitos T, puesto que no se activará la señal coestimuladora de CD28, estos linfocitos se volverán tolerantes contra estos antígenos, y también se generarán y mantendrán los linfocitos T reguladores. Todo esto contribuye a evitar los fenómenos de autoinmunidad en nuestro organismo.

Además de las moléculas CD28-B7, dentro de la familia de B7 existen numerosas moléculas presentes en la superficie de las células dendríticas que ejercen un papel tanto de coestimuladores como de inhibidores al interactuar con sus correspondientes receptores en los linfocitos T (**figura 19**). El receptor ICOS (*inducible coestimulator*, CD278) interactúa con su ligando ICOS-L (CD275) y ejerce un papel importante en las respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T, especialmente en el desarrollo y la activación de los linfocitos T foliculares. En lo referente a los receptores inhibidores, dentro de esta familia se encuentran CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) y PD-1 (*programmed death 1*), que interactúan con los ligandos de las células dendríticas B7 y PD-L1/PD-L2, respectivamente. El CTLA-4 tiene mucha más afinidad que CD28 para B7, por ello en condiciones de “reposo”, que es cuando las células dendríticas expresan bajas cantidades de B7, éste se unirá preferencialmente al CTLA-4 en lugar de a CD28, con lo que prevalece la inhibición del linfocito T en lugar de su activación. CTLA-4 inhibe de manera competitiva la unión de CD28 a B7 y produce señales inhibitorias que bloquean la activación del TCR.

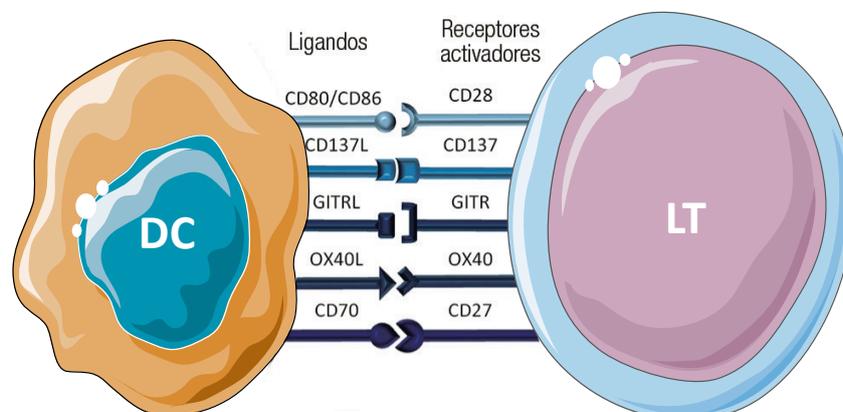


Figura I9. Principales moléculas coestimuladoras y sus ligandos. DC: célula dendrítica; LT: linfocito T. Adaptado de (120).

Existen otras vías coestimuladoras además de las ya mencionadas. Moléculas en la superficie de los linfocitos como CD2 o las integrinas envían señales coestimuladoras, aunque su importancia en la activación de los linfocitos T está menos clara que la familia del CD28. Miembros de la superfamilia del receptor del TNF y sus ligandos, como OX40 (CD134) o 4-1BB (CD137), expresados en linfocitos T activados, mantienen la supervivencia celular.

Los linfocitos T activados también expresan el ligando de CD40 (CD40L), que al unirse al CD40 de las células dendríticas, induce el aumento de expresión de moléculas B7 y la secreción de citocinas, que a su vez promueven la diferenciación de los linfocitos T. de esta manera, la vía del CD40 estimula las respuestas de los linfocitos T al inducir expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas en las células dendríticas, sin que el propio CD40L actúe como molécula coestimuladora por sí misma.

3.3. Activación de los linfocitos T

Gracias al proceso de activación de los linfocitos T es posible generar, a partir de un único linfocito T *naïve*, un gran número de linfocitos T efectores específicos para un antígeno capaces de eliminar al invasor, así como una población de linfocitos T de memoria de vida larga que podrán reaccionar rápida y eficazmente contra ese mismo antígeno si vuelve a aparecer.

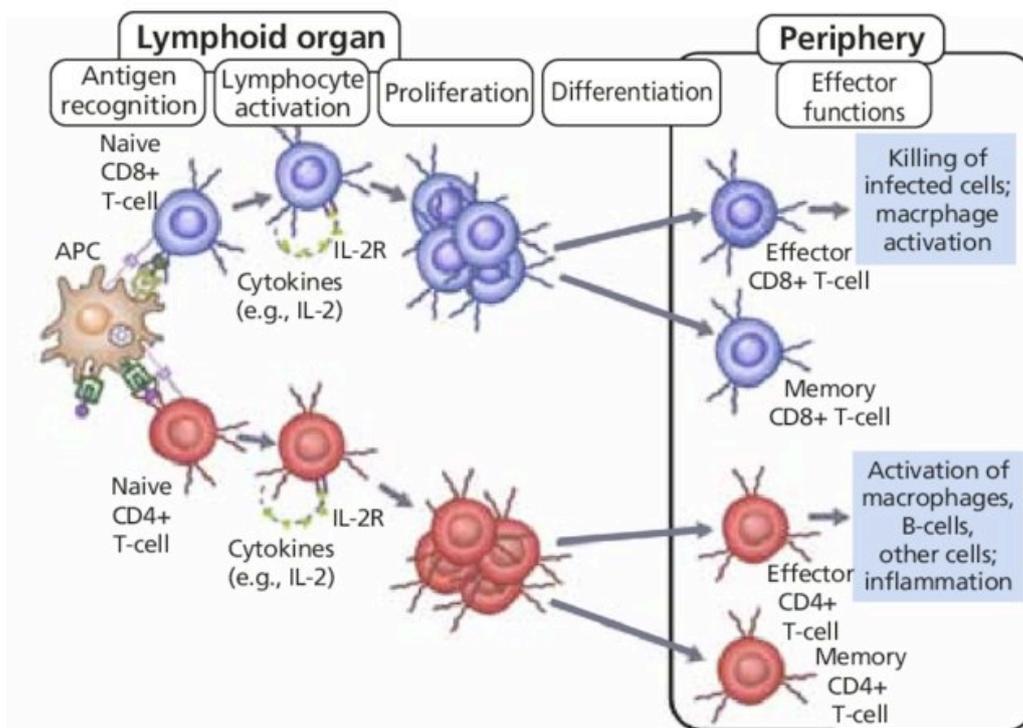


Figura I10. Fases de la activación de los linfocitos T. APC, *antigen presenting cell*; IL-2, *interleukin 2*; IL-2R, *interleukin 2 receptor*. Adaptado de (121).

Como hemos comentado anteriormente, esta activación se produce de manera habitual en los ganglios linfáticos, donde tiene lugar el encuentro entre el linfocito T *naïve* y la célula dendrítica con el complejo MHC-péptido. Aquí, los linfocitos T *naïve* están en constante circulación e interaccionando con las células dendríticas en busca de antígenos, hasta que encuentran un antígeno frente al cual expresan receptores específicos. Una vez reconocido el antígeno junto con otros estímulos activadores, los linfocitos T activados comienzan a proliferar (expansión clonal), liberar citocinas, aumentar la expresión de diversas moléculas de superficie y se diferencian hacia linfocitos T efectores y de memoria (**figura I10**).

Una vez activados en los ganglios linfáticos, los linfocitos migran hacia diferentes zonas del organismo, donde se encontrarán de nuevo con el antígeno específico y eliminan el origen del mismo. Los linfocitos T efectores CD4+, conocidos como linfocitos T colaboradores, secretan citocinas y expresan moléculas de superficie para estimular a otras células del sistema inmunitario: activan la fagocitosis de los microbios por parte de los macrófagos, reclutan leucocitos, estimulan la inflamación y la función barrera de las mucosas, y algunas permanecen en los ganglios linfáticos favoreciendo la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno. Los linfocitos T efectores CD8+, conocidos como linfocitos T citotóxicos, eliminan aquellas células que están infectadas y células tumorales que presentan antígenos asociados a moléculas del MHC de clase I, además de secretar citocinas que favorecen la inflamación y la activación de los macrófagos.

Además de los mecanismos efectores ya mencionados, los linfocitos T activados también pueden diferenciarse a linfocitos T de memoria, que jugarán un papel clave en futuras exposiciones a los antígenos. Estas células tienen una vida media larga y se encuentran recirculando por el organismo, especialmente en tejidos mucosos, piel y órganos linfáticos. Si vuelven a encontrarse con el mismo antígeno que los activó, estos linfocitos generan una respuesta más rápida, potente y eficaz que la de la primera exposición, generando nuevas células efectoras que eliminan la fuente del antígeno en cuestión.

Una vez los linfocitos efectores han eliminado el elemento extraño del cual provenía el antígeno, disminuyen su respuesta hasta morir por apoptosis. Esto es debido a que, a medida que los linfocitos van eliminando la amenaza, hay también menos antígenos que los linfocitos pueden reconocer, con lo que los linfocitos no reciben los estímulos de supervivencia necesarios para seguir actuando y proliferando. Además, existen unas vías de inhibición, que se activan tras una exposición prolongada al antígeno, para asegurar un estado de equilibrio y

evitar una estimulación exagerada del sistema inmunitario. Estas vías de inhibición, como veremos más adelante, juegan un papel importante en el desarrollo de los tumores y en el diseño de estrategias de inmunoterapia contra el cáncer.

3.4. Papel de las DCs en el desarrollo de tumores

Hemos visto que las células dendríticas desempeñan un papel muy importante en el inicio de la inmunidad o tolerancia antígeno-específica. Las funciones de estas células vienen determinadas por la integración de las señales que perciben del entorno a través de sus receptores de reconocimiento de patrones de patógenos y de peligro (PAMPs, *pathogen-associate molecular patterns* y DAMPs, *damage-associate molecular patterns*) (112).

En la **figura I11** podemos ver un resumen esquemático de cómo las células tumorales pueden afectar a distintas funciones de las DCs. Hemos de tener en cuenta que la mayoría de los datos que se han obtenido acerca de las funciones y subtipos de células dendríticas provienen de modelos murinos, con las limitaciones que ello supone.

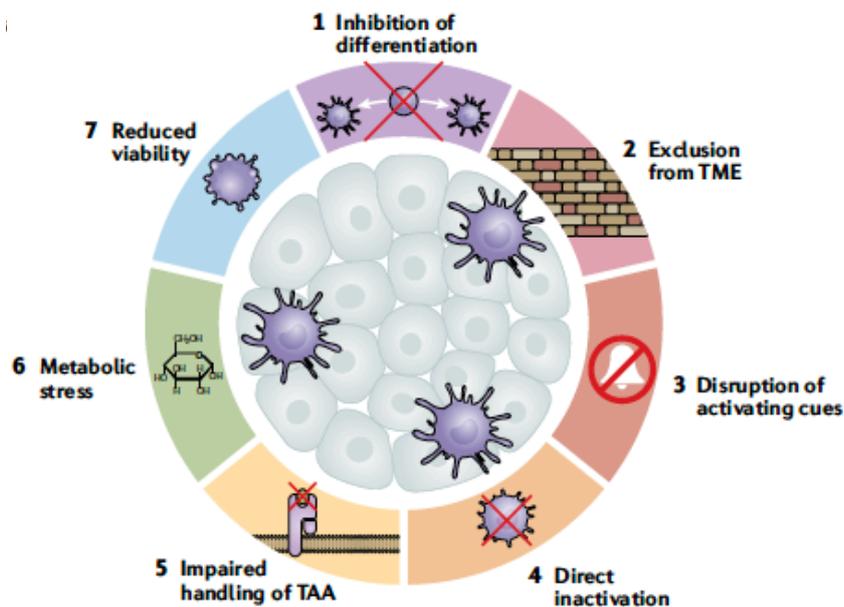


Figura I11. Funciones de las células dendríticas alteradas por tumores. Adaptado de (119). TME, *tumor microenvironment*; TAA, *tumor associated antigens*.

3.4.1. Actividad antitumoral de las células dendríticas

Las células dendríticas son las encargadas de estimular a las principales células efectoras de la respuesta inmunitaria antitumoral, los linfocitos T CD8, a través de la presentación cruzada de los antígenos tumorales. Las cDC1 se asocian con una mayor capacidad para llevar a cabo esta presentación cruzada a los linfocitos T CD8, además de favorecer la polarización de los

linfocitos CD4+ hacia una respuesta de tipo Th1 (119). A pesar de que este mecanismo se asocia con frecuencia a las cDC1, las cDC2 y las MoDCs también pueden realizar la presentación cruzada de antígenos, siendo además las cDC2 esenciales para la estimulación de las respuestas antitumorales de los linfocitos T CD4 (122).

Además de su papel en la presentación cruzada, las células dendríticas desempeñan otras funciones relevantes. En función de las señales que perciban del ambiente, las células dendríticas madurarán y expresarán en su superficie diversas moléculas coestimuladoras y receptores de quimiocinas, destacando el papel del CCR7. Este receptor permite la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos (123) y también hacia el microambiente tumoral, reclutadas por sus ligandos CCL19 y CCL21 (124).

Las moléculas coestimuladoras mejor caracterizadas que aumentan su expresión tras la maduración de las células dendríticas son CD80 y CD86, que activan o inhiben a los linfocitos T a través de su interacción con los ligandos CD28 y CTLA-4, respectivamente (125). Pero existen otras moléculas coestimuladoras en las células dendríticas que favorecen la activación de los linfocitos T: la interacción entre CD40 las células dendríticas y CD40L en los linfocitos T favorece la activación de las células dendríticas; CD137L (4-1BBL) promueve la activación y supervivencia de los linfocitos T CD4 y CD8 al interactuar con CD137 (126); OX40L, también presente en macrófagos, favorece la supervivencia de los linfocitos al interactuar con OX40 (127); GITRL, tras interactuar con GITR en los linfocitos T CD8 promueve la respuesta inmunitaria de éstos y la resistencia de los mecanismos inmunosupresores mediados por los linfocitos T reguladores (128); CD70 favorece la presentación cruzada, la diferenciación y las actividad antitumoral de los linfocitos T CD8 (129).

Otra de las funciones de las células dendríticas que contribuyen a luchar contra las células tumorales, es la liberación de citocinas. Tanto cDC1 como cDC2 producen IL-12 tras la estimulación de sus TLRs (130–132), aunque los niveles de IL-12 en diversos cánceres se han asociado con la mayor infiltración de cDC1 (130). Esta IL-12 contribuye a la activación de los linfocitos T CD8 y Th1. cDC1 también producen quimiocinas que reclutan linfocitos T CD8 a la zona del tumor, como CXCL9 y CXCL10 (133), modulando así el microambiente tumoral.

3.4.2. Tolerancia hacia el tumor generada por las células dendríticas

Ya hemos comentado anteriormente como, ante la presión ejercida por la respuesta inmune antitumoral, se generan variantes de células tumorales que son resistentes a los mecanismos de eliminación del sistema inmunitario. Las células tumorales aprovechan esta presión inmunitaria de las células dendríticas para promover la tolerancia.

Cuando se produce la presentación de los antígenos tumorales en ausencia de señales coestimuladoras, esto da lugar a linfocitos T en situación de anergia (134), así como un aumento de la unión a los receptores inhibidores de los linfocitos T. Los receptores CD80 y CD86 en las células dendríticas se unen con mayor afinidad al CTLA-4 de los linfocitos T que al CD28, con la consecuente inhibición de estos linfocitos (125). Otras moléculas inhibidoras expresadas por las células dendríticas también son relevantes, como PD-L1 y PD-L2, que se unen al PD-1 de los linfocitos T, VISTA (*V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*), también de la familia PD1 que inhibe la actividad antitumoral de los linfocitos T (135); o CD31, que induce la diferenciación de las células dendríticas hacia un fenotipo más tolerogénico, favoreciendo a su vez la diferenciación de los linfocitos T hacia T reguladores en lugar de hacia Th1 (136).

Otro mecanismo de las células dendríticas que permite modular la tolerancia de los tumores es a través de la disponibilidad de ciertos sustratos esenciales para los linfocitos T. Las células dendríticas, tras la unión de CD80 o CD86 a CTLA-4, también inducen la expresión de la enzima IDO1 (*indoleamine 2,3-dioxygenase 1*), que produce la depleción de triptófano del medio extracelular (137). Se ha observado un aumento de expresión de IDO1 en células dendríticas asociadas a tumores, así como una disminución de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8, de las células NK y de las células plasmáticas, contribuyendo además a la diferenciación de los linfocitos T reguladores (138).

3.4.3. Inhibición de las células dendríticas en el microambiente tumoral

En el microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*) existen numerosos elementos capaces de inhibir la activación y actividad efectora de las células dendríticas (119). Conociendo en profundidad estos mecanismos, podrían desarrollarse terapias capaces de frenar estos efectos inmunosupresores y potenciar el efecto inmunogénico de las DCs para eliminar las células tumorales.

Uno de los principales mecanismos inmunosupresores ejercidos por parte de las células tumorales es su capacidad para restringir el acceso al microambiente tumoral, bloqueando tanto el reclutamiento como la diferenciación de células del sistema inmunitario (119). Mediante la disminución de los niveles de quimiocinas como CCL4 se limita el reclutamiento de cDC1 (139). La liberación de PGE2 (prostaglandina E2) inhibe de manera directa la maduración, supervivencia y diferenciación de las DCs (140), e indirectamente su reclutamiento y activación a través del bloqueo de las células NKs (141–144), reduciendo la expresión de CCL5 y secreción de FLT3L (*FMS-related tyrosine kinase 3 ligand*, un factor esencial para el desarrollo de las cDC)

(145) por parte de las mismas. Otra estrategia de las células tumorales que afecta a la diferenciación de DCs es la secreción de IL-6 (146).

A pesar de estos factores que restringen su acceso, algunas células dendríticas son capaces de llegar hasta el TME, donde se enfrentarán a nuevos obstáculos para poder eliminar a las células tumorales. Tanto la activación como los mecanismos implicados en la presentación antigénica pueden verse afectados, impidiendo a las DCs llevar a cabo sus funciones adecuadamente. Esto dará lugar a una deficiente activación e incluso inducción de tolerancia de los linfocitos T, que nos serán capaces de destruir el tumor. En condiciones normales, la eliminación de células tumorales libera antígenos y señales de peligro, como HMGB1 (*high mobility group protein B1*, una alarmina) (147) o SIRP α (*signal-regulatory protein α*) (148) que inducen la activación de linfocitos T y DCs y pueden verse inhibidas por la expresión de TIM3 en las DCs (149) o de CD47 en las células tumorales (148). La liberación de IL-10 por parte de versican y TAMs también afecta a secreción de citocinas por parte de las DCs (130,146).

Como acabamos de ver, a pesar de la capacidad de las células dendríticas para estimular la inmunidad antitumoral, el TME cuenta con recursos para bloquear estos efectos e incluso para favorecer un fenotipo inmunosupresor de las DCs, que dificultan un desarrollo adecuado de la respuesta inmunitaria para lograr la erradicación de los tumores. A continuación, expondremos posibles estrategias que puedan modular a las DCs para desempeñar de manera más eficiente su función antitumoral.

3.4.4. Relación entre células dendríticas y terapias antitumorales

Actualmente, existen numerosas alternativas en el tratamiento del cáncer. Cada una de ellas actúa a diferentes niveles en el llamado “ciclo del sistema inmunitario y cáncer” (ya comentado en la **figura I2**), con lo que dichas terapias pueden afectar de diversas maneras a la función de las células dendríticas (**figura I12**). Conociendo estas interacciones, podremos desarrollar estrategias de terapias combinadas para eliminar los tumores de manera más eficaz.



Figura I12. Interacciones entre células dendríticas y terapias antitumorales. Adaptado de (150).

3.4.4.1. Quimioterapia

La mayor parte de los tratamientos quimioterápicos, como paclitaxel o doxorubicina, actúan induciendo una muerte celular inmunogénica de las células tumorales (151,152). Esto genera señales de peligro (alarminas y DAMPs) que, junto con la liberación TAAs tras la destrucción de las propias células, servirá para que las DCs puedan captar esos antígenos y presentarlos a los linfocitos T, que se activarán al encontrarse en un ambiente inmunogénico. Entre las principales moléculas liberadas durante la muerte celular inmunogénica se encuentran la calreticulina (estimula la captación de aquellas células que lo expresan) (153), el ATP (promueve reclutamiento de DCs y producción de IL-1 β) (154), la HMGB1 o la HSP90 (*heat shock protein 90*), que favorecen la captación y presentación antigénica a las DCs (155,156).

Por otro lado, existen otras quimioterapias que no producen una muerte celular inmunogénica, pero que son capaces de estimular a las DCs a través de otros mecanismos. Los tratamientos basados en platino disminuyen la expresión de PD-L2 tanto en las DCs como en las células tumorales (157), favoreciendo así la estimulación de los linfocitos T.

Puesto que cada agente quimioterápico tiene un efecto modulador diferente, conociendo estos mecanismos podremos diseñar la combinación que nos permita un efecto antitumoral más efectivo.

3.4.4.2. Radioterapia

A pesar de que la radioterapia tiene un efecto en general inmunosupresor, también puede ejercer un efecto beneficioso sobre los tumores (158), induciendo una muerte celular inmunogénica (159). El tratamiento con radioterapia tiene efectos tanto locales como abscopales (160). A nivel local, provoca la liberación de ROS (*reactive oxygen species*), DAMPs y otros mediadores que modulan el TME (161) y también favorece la *upregulación* de moléculas de MHC de clase I (162). El aumento de la muerte celular inmunogénica, así como al liberación de los diversos mediadores de “peligro”, favorecen la maduración, migración y activación de las células dendríticas y además su capacidad para realizar una presentación cruzada de los antígenos tumorales (163). Todo esto hace que la radioterapia tenga un efecto beneficioso en la actividad antitumoral de las células dendríticas al favorecer su acción activadora sobre los linfocitos T citotóxicos.

3.4.4.3. Checkpoints inhibitors

Los inhibidores de punto de control (*checkpoint inhibitors, ICIs*) han supuesto una revolución en el tratamiento contra el cáncer. Aunque este grupo de terapias se detallarán en profundidad en el apartado 5 de esta tesis, cabe mencionar la relevancia de estos fármacos en la función de las células dendríticas. Al bloquear estas moléculas inhibitorias la función de activación de la respuesta inmune es doble, ya que por un lado se estimula directamente al linfocito T, pero por otra se estimula a la propia célula dendrítica, que también expresa estas moléculas inhibitorias (como PD-L1 al unirse a PD-1 o CD80 al unirse a CTLA-4) (164). De esta manera, estas moléculas actúan en la fase de *priming* y activación de las células dendríticas

3.4.4.4. Terapia celular adoptiva

Dentro de este grupo nos encontramos los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), los linfocitos con receptor quimérico antigénico (CARTs) o los linfocitos con el TCR modificado. Este tipo de terapias, que también desarrollaremos más en detalle en el próximo apartado, favorecen la migración de las células hacia la zona tumoral, crean un microambiente tumoral más favorable, liberan antígenos tumorales gracias a la inducción de la muerte de células tumorales, estimulan el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1 y favorecen la

maduración de las células dendríticas gracias a la interacción de las moléculas CD40-CD40L, entre otros (164).

4. Estrategias de inmunoterapia del cáncer

A diferencia de la mayoría de las terapias oncológicas, que van dirigidas contra el tumor, la inmunoterapia se basa en intervenir sobre las células del propio sistema inmunitario, que de manera indirecta acabarán atacando y afectando a las células tumorales. Entre otras ventajas, esto supone que la inmunoterapia no es tumor-específica, y la misma podría aplicarse para el tratamiento de distintos tipos de tumores.

Además, los tratamientos antineoplásicos clásicos atacan a menudo a células en división o con un alto consumo de metabolismo, con lo que dañan también a un gran número de células sanas, lo que se traduce en una toxicidad para el paciente considerable. Sin embargo, la inmunoterapia puede ser específica frente a los antígenos tumorales, con lo que no dañan a las células del tejido sano.

En los últimos años se han desarrollado muchos tipos de inmunoterapias, con distintos mecanismos de acción, como puede verse en la **figura I13**.

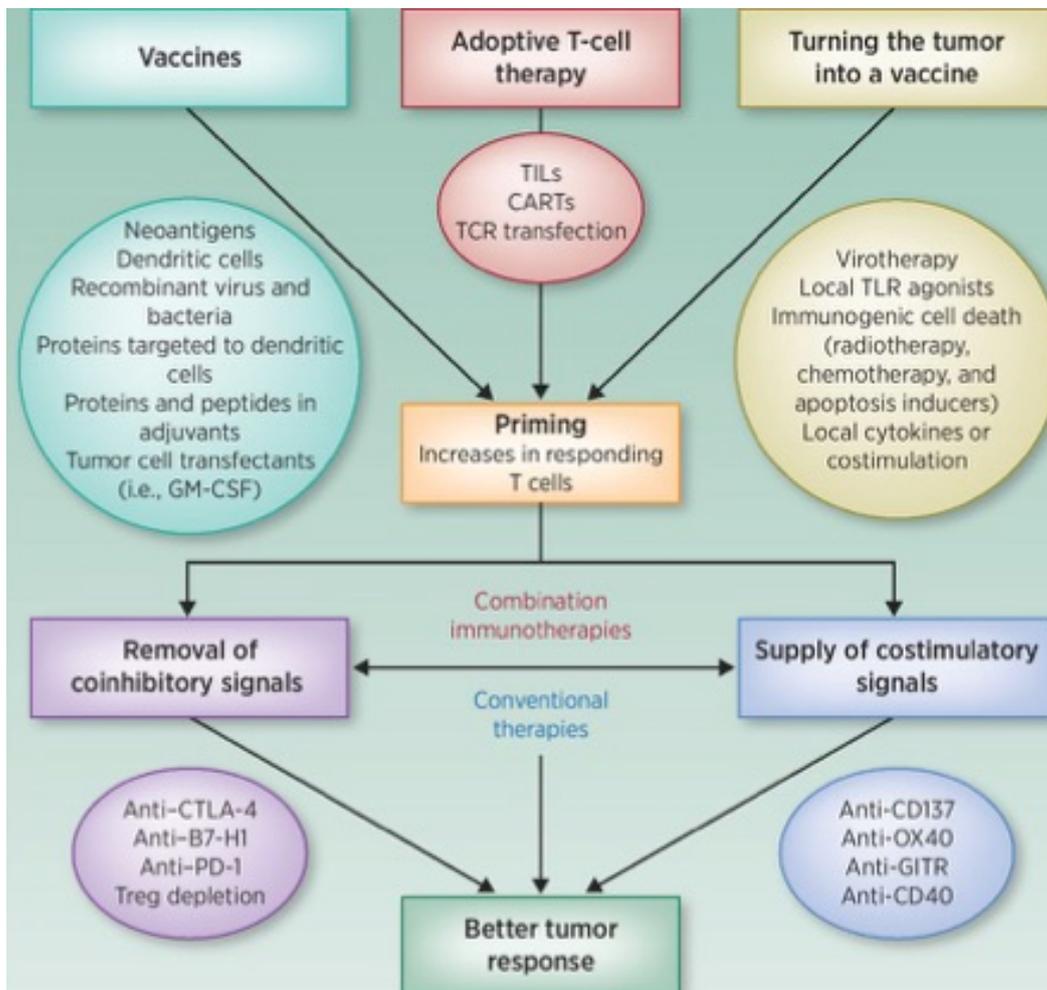


Figura I13. Tipos de inmunoterapia. Adaptado de (165).

Se podría dividir esta inmunoterapia en 2 grandes grupos: la inmunoterapia activa, que consiste en potenciar el sistema inmune del paciente; y la inmunoterapia pasiva, en la cual se administran directamente anticuerpos o linfocitos T específicos frente a los tumores. A continuación, expondremos con más detalle estas 2 modalidades terapéuticas, prestando especial atención a las aplicaciones en cáncer colorrectal.

4.1. Inmunoterapia activa

Con esta estrategia se pretende potenciar la respuesta inmune antitumoral que ya existe en el paciente, pero que se encuentra disminuida o inhibida.

4.1.1. Vacunas

La administración de vacunas con antígenos tumorales consigue sensibilizar a las células del sistema inmunitario contra esos tumores. Estos antígenos pueden administrarse de distintas maneras, ya sean péptidos recombinantes, células tumorales inactivadas, vacunas virales o de células dendríticas (que detallaremos más adelante en el apartado 6).

Esta estrategia permite crear vacunas personalizadas, secuenciando el tumor para detectar las mutaciones que darán lugar a neoantígenos potencialmente inmunogénicos (escogidos mediante algoritmos bioinformáticos) y posteriormente sintetizando y clonando estos antígenos en distintos vehículos (**figura I14**).

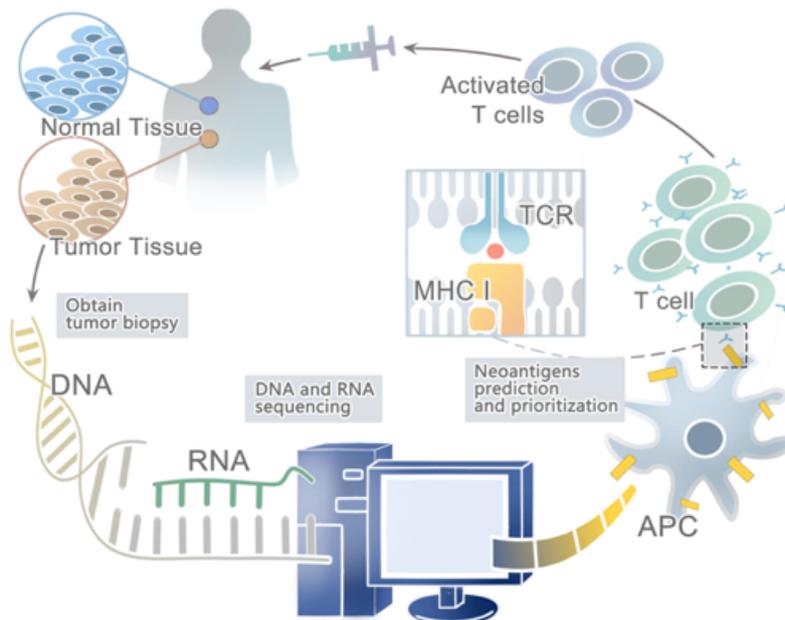


Figura I14. Obtención de vacunas con antígenos tumorales. Representación esquemática de la identificación y priorización de neoantígenos mediante análisis bioinformáticos a partir de muestras tumorales. Adaptado de (166).

Para lograr una respuesta inmune efectiva, es necesario administrar la vacuna con diversos adyuvantes, como ligandos de TLR (ARNbc o BCG), citocinas (GM-CSF o IL-12) o utilizar vectores víricos que codifican antígenos tumorales.

Los resultados globales obtenidos con las vacunas antitumorales son muy variables. Esto puede ser debido a que este tipo de vacunas no son preventivas si no que se administran una vez que ya se ha establecido el tumor, con lo que tienen que luchar contra los mecanismos de evasión del tumor ya establecidos.

Un caso diferente es el de aquellos tumores inducidos por virus (ya mencionados en el apartado 2 de antígenos tumorales). En estos casos, sí es posible administrar las vacunas antitumorales de forma preventiva, ya que se conocen los antígenos víricos o se emplean directamente los virus atenuados. Este tipo de vacunas se han utilizado de manera exitosa para, por ejemplo, reducir la incidencia del cáncer de cérvix inducido por el VPH.

A pesar de que el empleo terapéutico de las vacunas con células dendríticas se englobaría en el presente grupo, debido a su relevancia en el presente trabajo este tema se desarrollará en profundidad en el apartado 6.

4.1.2. Bloqueantes de las vías inhibitoras

El bloqueo de las vías inhibitoras, o puntos de control (*checkpoints*) ha supuesto en los últimos años una revolución en el tratamiento del cáncer en relación a las respuestas clínicas en pacientes con tumores como melanoma o cáncer de pulmón. Este método se basa en inhibir los mecanismos que las células tumorales aprovechan para bloquear la estimulación de la respuesta inmunitaria (ya comentados en el apartado 2 de mecanismos de inhibición tumoral).

Esta estrategia, que consiste en utilizar anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 o PD-1, entre otros, será desarrollado en profundidad en el apartado 5.

4.1.3. Administración de citocinas

La administración exógena de citocinas estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y otras células que intervienen en la respuesta inmunitaria antitumoral (31).

La citocina que se ha utilizado con mayor frecuencia es la IL-2 intravenosa. Sus primeros usos terapéuticos tuvieron lugar en la década de los 80, para el tratamiento de carcinoma renal (167) y melanoma (168) en los cuales se observaron regresiones tumorales, y gracias a lo cual se aprobó su uso en estos tumores de estadio avanzado. Sin embargo, el hecho de que

tenga que ser utilizada a altas dosis induce el síndrome de fuga capilar, al estimular la producción de otras citocinas proinflamatorias, resultando bastante tóxica y difícil de tolerar por los pacientes.

El IFN- α es otra de las citocinas que está autorizada, para el tratamiento de melanoma, tumores carcinoides, leucemias y linfomas. Esta citocina inhibe la proliferación de las células tumorales, estimula la actividad citotóxica de las células NK y aumenta la expresión de moléculas de MHC en las células tumorales (169).

Los factores de crecimiento hematopoyéticos como GM-CSF y G-CSF se administran conjuntamente con otras terapias para disminuir la neutropenia y la trombocitopenia inducidas por ciertas quimioterapias. Existen otras citocinas, como TNF e IFN- γ , que han mostrado su eficacia antitumoral en modelos animales, pero sus efectos tóxicos han limitado su uso en humanos (170).

La estimulación con citocinas es un procedimiento muy poco específico que induce la activación de todas las células sin discriminar las específicas por el tumor respecto a las que no, con lo que este proceso está asociado a elevados efectos adversos.

No existe actualmente ninguna citocina aprobada para el tratamiento del cáncer colorrectal.

4.1.4. Estimulación inespecífica

Otra de las alternativas para estimular la respuesta antitumoral es la administración de sustancias que induzcan procesos inflamatorios o la activación policlonal de los linfocitos.

Actualmente se utiliza el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) intravesical para el tratamiento del cáncer de vejiga. Estas micobacterias atenuadas activan principalmente a los macrófagos y otros componentes del sistema inmune, favoreciendo la destrucción de las células tumorales.

4.2. Inmunoterapia pasiva

La inmunoterapia pasiva supone la transferencia directa de células del sistema inmunitario activadas o bien sus efectores, como los anticuerpos específicos frente al tumor.

4.2.1. Terapia celular adoptiva

Este tipo de tratamiento consiste en aislar células del paciente (o de un donante), procedentes del propio tumor (TILs, *tumor infiltrating lymphocytes*) o de sangre periférica (linfocitos modificados genéticamente con un TCR transgénico o con un receptor quimérico, CARTs), para estimularlas, expandirlas y potenciar su especificidad antitumoral (**figura I15**).

Éstas, ya transformadas en células específicas de antígenos asociados a tumores, son posteriormente administradas de nuevo al paciente. Una de las principales ventajas de este tipo de terapia es la capacidad de hacerla personalizada, ya que las células administradas (ya sean autólogas o alogénicas) son específicas para el paciente en concreto y su tumor.

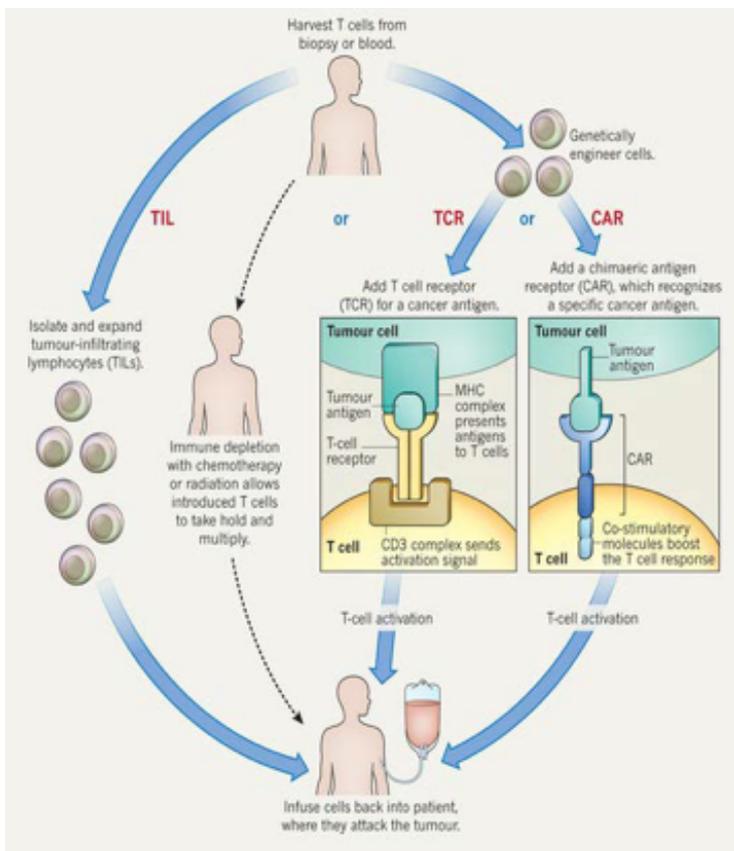


Figura I15. Principales opciones de inmunoterapia pasiva. El proceso general de obtención de este tipo de terapias celulares consiste en obtener células del paciente, a partir de una biopsia (TILs) o de sangre periférica (TCR y CART), modificarlas y/o expandirlas para volver a reinfundirlas en el paciente. *TILs*: tumor infiltrating lymphocytes; *TCR*: T cell receptor; *CAR*: chimeric antigen receptor. Adaptado de (171).

La primera evidencia de la viabilidad de esta terapia tuvo lugar en 1966 (172), donde se demostró cómo la administración de leucocitos derivados de pacientes y células tumorales autólogas inducían regresión tumoral en cáncer avanzado.

4.2.1.1. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)

La terapia celular adoptiva utilizando linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) tiene su origen en los primeros estudios realizados durante la década de los 80 por el equipo del Dr Rosenberg en el National Cancer Institute en Bethesda. Primero, en modelos murinos, demostró que era posible aislar linfocitos que se encontraban infiltrando el tumor, expandirlos *ex vivo* con IL-2 y re-infundirlos logrando disminuir el tamaño del tumor (173). Posteriormente, ya en humanos, demostró la capacidad antitumoral de los TILs en pacientes con melanoma metastásico, con una tasa de respuesta del 34%, aunque la duración de la misma era de tan solo 4 meses (174). En los sucesivos estudios se demostró que la combinación de TILs con altas dosis de IL-2 y un

acondicionamiento previo linfodepletivo inducía tasas de respuesta elevadas y duraderas en pacientes con melanoma avanzado (175–179), **figura I16**.

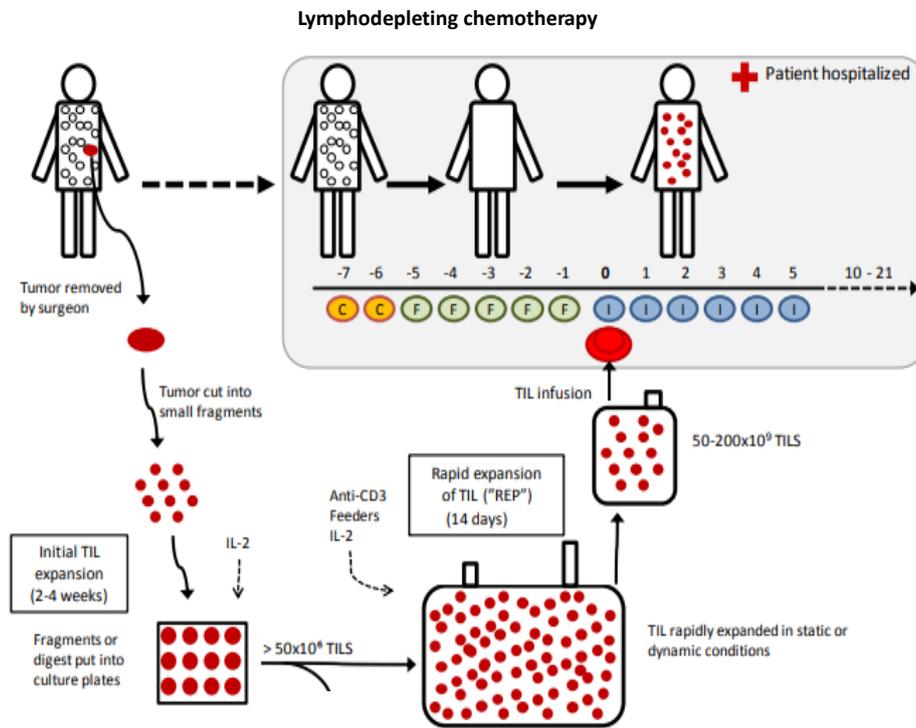


Figura I16. Obtención y administración de TILs. Adaptado de (Svane I, ESMO congress 2018).

Estos buenos resultados en melanoma hicieron que su uso se extendiera a otros tipos de cáncer (180). Sin embargo, los resultados en otros tumores no han sido tan exitosos como en melanoma. Dicha falta de consistencia se debe probablemente a que el melanoma es el tumor con la mayor carga mutacional (con un mayor número de neoantígenos) (181), mientras que el resto de tumores se caracterizan por la heterogeneidad en cuanto a la obtención y calidad de los TILs, así como un microambiente tumoral más complejo (182,183).

Uno de los inconvenientes que presenta este tipo de terapia, además de la falta de infiltración en algunos tumores que condiciona la capacidad para aislar y expandir los TILs, es el tratamiento que lleva asociado. Como ya se ha mencionado con anterioridad, para favorecer el efecto citotóxico en el microambiente tumoral es necesario acondicionar al paciente previamente con quimioterapia linfodepletiva (fludarabina/ciclofosfamida), que conlleva una toxicidad asociada (175). Además, para favorecer la expansión y supervivencia *in vivo* de los TILs, también se administran altas dosis de IL-2, que suele ser mal tolerada por los pacientes y que genera el llamado síndrome de liberación capilar, con una serie de efectos adversos asociados (184).

A pesar de estas limitaciones, y gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, se han conseguido desarrollar terapias personalizadas con TILs específicos de neoantígenos, consiguiendo respuestas completas en tumores sólidos distintos a melanoma, como el cáncer de mama (185). Aunque en los últimos años el uso de esta terapia se ha extendido más allá del melanoma, y algunos ensayos clínicos incluyen el tratamiento de diversos tumores sólidos, incluidos gastrointestinales, no es una terapia extendida para el tratamiento del cáncer colorrectal.

4.2.1.2. TCR transgénicos (tTCRs)

A diferencia de la terapia con TILs, en la cual se seleccionan linfocitos procedentes del tumor, en las terapias con tTCRs y CARTs los linfocitos que puedan reconocer el tumor se seleccionan de manera exógena, se diseñan modificando los linfocitos genéticamente, se expanden *ex vivo* y se vuelven a administrar al paciente. En la terapia con tTCR, una vez seleccionado el linfocito que tiene la especificidad tumoral deseada (se seleccionan los genes que codifican las cadenas α y β del TCR, que son las que reconocen el antígeno), el TCR del mismo es clonado y reintroducido en los linfocitos del paciente mediante transducción viral (186).

Existen varias diferencias entre los linfocitos con TCRs modificados genéticamente y los CARTs. En el caso de las terapias con tTCRs, los linfocitos sólo pueden reconocer aquellos antígenos que son presentados en el MHC, con las limitaciones para el reconocimiento HLA-restringido y la baja expresión de moléculas MHC que promueven algunas células tumorales (187). Por su parte, los CARTs no presentan restricción para MHC y pueden reconocer los antígenos sin que éstos sean presentados. Sin embargo, la ventaja que presentan los tTCRs con respecto a los CARTs, es que los primeros son capaces de responder a antígenos que presentan una baja densidad de expresión en el microambiente tumoral, además de que pueden reconocer antígenos tanto intracelulares como extracelulares; por su parte, los CARTs sólo son capaces de reconocer antígenos expresados en la membrana celular (188,189).

La gran ventaja de los tTCRs es su potencial versatilidad, ya que pueden reconocer a una gran variedad de antígenos. Sin embargo, las toxicidades relacionadas *on-target-off-tumor* suponen un reto a la hora de seleccionar el antígeno diana. A modo de ejemplo, en ensayos clínicos con tTCRs específicos del antígeno MAGE-3 diversos pacientes sufrieron toxicidad neurológica y cardíaca que incluso ocasionaron su muerte (190,191).

Pese a estas limitaciones, los datos de eficacia de esta terapia en diversos ensayos son prometedores, como es el caso de un ensayo con tTCR específicos de NY-ESO-1 en pacientes con mieloma que mostró unos datos del 80% de respuesta (192).

En cuando al cáncer colorrectal, la primera aplicación de este tipo de terapia fue dirigida contra el antígeno carcinoembrionario (CEA, *carcinoembryonic antigen*), donde se evidenció respuesta clínica pero con graves efectos adversos, ya que todos los pacientes experimentaron colitis severa debido a la presencia de CEA en células sanas (193). Tras este primer intento, le siguieron otros con tTCR dirigidos hacia otros antígenos, como TGF β II (*transforming growthfactor β - receptor type II*) (194), que terminó prematuramente debido a los efectos adversos; y otros como KRAS G12V (NCT03190941) y KRAS G12D (NCT03745326).

4.2.1.3. CARTs

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior de la terapia con tTCRs, en el caso de la terapia con linfocitos con receptor de antígeno quimérico (CARs, *chimeric antigen receptor*) también se seleccionan los linfocitos capaces de reconocer al tumor de manera exógena. En este caso, la estructura del CAR es la siguiente: un dominio de reconocimiento que se une al antígeno tumoral, generalmente derivado de la región variable de un anticuerpo (scFv, *single chain variable fragment*), unido a dominios de activación intracelular derivados del complejo TCR/CD3 (188), junto con moléculas co-estimuladoras de diversos tipos (CD28, 4-1BB, OX40 o ICOS), que favorecen la activación, persistencia, proliferación y producción de citocinas de las células CAR *in vivo* (195,196) (Figura I17).

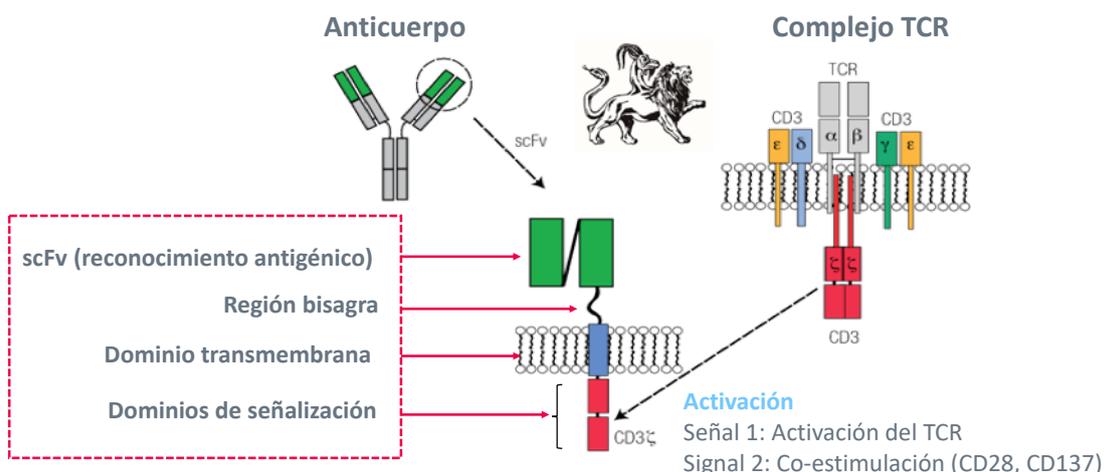


Figura I17. Estructura de un CAR. La parte extracelular, que confiere la capacidad para reconocer el antígeno tumoral, deriva de la región variable de un anticuerpo. La parte intracelular, que confiere la capacidad de activación del linfocito T, deriva La región bisagra y transmembrana derivan de distintas moléculas, principalmente CD8. Adaptado de (120).

De esta manera, obtenemos un linfocito T capaz de reconocer específicamente el antígeno tumoral de interés (gracias a la especificidad que le confiere la parte del anticuerpo), que se activará al reconocer dicho antígeno, ya que consta de las moléculas necesarias para generar las señales de activación del linfocito (dominios del TCR) (197). Como ya se ha mencionado anteriormente, la principal diferencia entre los CARs y los tTCRs es que los CARs no necesitan que los antígenos sean presentados a través del MHC, ya que el reconocimiento lo hacen directamente a través de sus dominios de anticuerpo (198).

Este tipo de terapia ha mostrado gran eficacia especialmente en neoplasias hematológicas, siendo la terapia CAR dirigida contra CD19 (CAR19) la más estudiada hasta la fecha, para el tratamiento leucemias y linfomas de tipo B. Tras el primer ensayo clínico en que se demostró la eficacia de esta inmunoterapia, en leucemia linfática crónica (19), le siguieron otros muchos estudios en los cuales se evidenciaban remisiones en pacientes con otras neoplasias de tipo B (199), especialmente leucemias linfáticas agudas (LLA) (200) y linfomas (201), con unas tasas de respuesta de más del 80% (202), logrando incluso una tasa de remisión completa a los 3 años de un 50% (203).

Los buenos resultados evidenciados en estos ensayos dieron lugar a la aprobación por parte de la FDA (*food and drug administration*) de la primera inmunoterapia CART en 2017: tisagenlecleucel (Kymriah™, Novartis) (204), para el tratamiento de LLA de tipo B en menores de 25 años (que en 2018 amplió su indicación al tratamiento de linfomas de tipo B en adultos). Ese mismo año se aprobó la segunda terapia CAR: axicabtagene ciloleucel (Yescarta™; Kite Pharma) (205), para el tratamiento de linfomas de tipo B del adulto.

El éxito mostrado por esta terapia CAR19 hizo que se ampliase la estrategia de los CARs con otros antígenos diana. Actualmente existen 5 terapias CART aprobadas por la FDA (4 con especificidad para CD19 y 1 para BCMA), resumidas en la **tabla 11**.

Tabla 11. CARTs aprobados comercialmente.

Nombre	Nombre comercial	Laboratorio	Especificidad	Indicación
Tisagenlecleucel	Kymriah™	Novartis	CD19	LLA-B en < 25 años
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta™	Kite Pharma	CD19	Linfoma-B adultos
Lisocabtagene maraleucel	BREYANZI®	Juno Therapeutics	CD19	Linfoma-B adultos
Brexucabtagene autoleucel	TECARTUS™	Kite Pharma	CD19	Linfoma de células del manto adultos
Varnimcabtagene autoleucel	Var-cel, ARI-0001	Hospital Clínic Barcelona	CD19	LLA-B en > 25 años
Idecabtagene vicleucel	ABECMA®	Bristol Myers Squibb	BCMA	Mieloma múltiple

Sin embargo, también se han observado recaídas y resistencias a esta terapia, ya que la presión ejercida sobre la molécula diana hace que el tumor pueda desarrollar con facilidad

mecanismos para escapar a esta presión del sistema inmune (como ya se comentó en el apartado 2.3. *Mecanismos de evasión tumoral*), principalmente por pérdida del antígeno diana (206).

Contrariamente a los buenos resultados obtenidos en neoplasias hematológicas, la eficacia de esta aproximación continúa teniendo limitaciones en tumores sólidos (207,208). A pesar de ello, existen dianas prometedoras como el antígeno pan-cáncer B7-H3 (CD276) (209), el receptor $\alpha 2$ de la interleucina 13 (IL13R $\alpha 2$) (210) y el factor de crecimiento epidérmico tipo III (EGFRvIII, *epidermal growth factor variant III*) (211) para glioblastoma, o CEA para cáncer colorrectal (212). Los principales desafíos son la dificultad para identificar al antígeno diana adecuado, así como encontrar el mejor abordaje que permita luchar contra microambiente tumoral inmunosupresor (213). Puede verse un resumen de estos ensayos con CARTs en la **tabla I2**.

Tabla I2: Resumen de resultados de ensayos clínicos con CART en tumores sólidos.

Antigen	Disease	Response	Observations	References
Her2	Colon cancer with lung and liver metastasis	1 death	High dose high affinity CAR-T cells (trastuzumab-based). Cytokine storm.	Morgan, 2010, Mol Ther
	Sarcoma	4/17 SD	CAR-T cell persistence in blood for 6 weeks (7/9) and tumors (2/2). Safe.	Ahmed 2015, JCO
	Rhabdomyosarcoma	1/1 CR (>20 meses)	Relapse at 6 months. Second remission achieved after second dose.	Hedge 2020, Nature Comm
GD2	Neuroblastoma	3/11 CR	Tumor regression correlated with CAR-T cell persistence. Safe.	Louis 2011, Blood
EGFR	Lung	2/11 PR 4/11 SD	CAR-T cells detected in the tumor. Decreased EGFR expression in 4/4 tumors after treatment.	Feng 2016, Sci China Life Sci
IL-13R α	Glioblastoma	1/4 CR 3/4 OR	Multiple local infusions.	Brown 2016, NEJM
Mesothelin	Pleural cancers	2/14 CR 5/14 PR 4/14 SD	In combination with anti-PD1 T-cell clonal expansion correlates with response IgG responses observed after treatment	Adusumilli, ASCO 2019 Cancer Discovery, 2021

A pesar de ser una de las inmunoterapias más prometedoras, otra de las limitaciones importantes que se ha visto en la práctica clínica es la toxicidad asociada (214). Los efectos adversos más frecuentes son el síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad, con una incidencia de aproximadamente un 50% y un 30-40%, respectivamente (215), mientras que la tasa de mortalidad puede ascender hasta el 15% (216).

Cabe mencionar un caso reportado de toxicidad grave tras la administración de un CART contra HER-2 (usando como dominio de reconocimiento un scFv derivado del trastuzumab) (217), administrado a una paciente con cáncer colorrectal. Tan solo 15 minutos tras la administración del CART, la paciente sufrió insuficiencia respiratoria, que requirió de intubación e ingreso en la unidad de cuidados intensivos. Posteriormente experimentó 2 paros cardíacos. A pesar el tratamiento de soporte y de la ventilación mecánica, la paciente falleció 5

días después debido al fallo pulmonar, hipotensión e isquemia generalizada. Este es un claro ejemplo de los potenciales efectos adversos que puede generar un CART dirigido contra antígenos que se expresan en tejidos sanos, como ocurre en gran parte de los CARTs utilizados en tumores sólidos.

En el caso del cáncer colorrectal, esta terapia es bastante escasa, siendo CEA la diana más estudiada, aunque con modestos resultados (218). El primer ensayo clínico de CARs en esta enfermedad usaba CART72, unas células dirigidas contra la glucoproteína asociada a tumor (TAG)-72, que demostraron seguridad pero eficacia limitada (219). Otros antígenos utilizados como diana para células CAR además de CEA han sido la guanilil ciclasa C (GUCY2C) (220), EGFR (221,222), TAG72 (*tumor-associated glycoprotein*) (219), EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) (223) HER2 o MUC1 (218) (**tabla I3**). Aunque algunos modelos preclínicos y fases iniciales de ensayos clínicos han mostrado eficacia, ésta es limitada y poco duradera en la mayoría de los pacientes (218), además de los efectos adversos potencialmente graves observados, principalmente colitis. Por tanto, la terapia CAR en pacientes con cáncer colorrectal resulta prometedora, aunque todavía queda mucho camino por recorrer.

Tabla I3. Ensayos clínicos activos con terapia CART en cáncer colorrectal. Adaptado de (218).

Target	Pathology	Trial ID	Study Phase	Administration	Patient Number	Year
EGFR IL-12	Metastatic colorectal cancer	NCT03542799	I/II	Systemic	20	2018
EGFR	EGFR-positive colorectal Cancer	NCT03152435	I/II	Systemic	20	2017
NKG2D	Metastatic colorectal cancer	NCT03692429	I	Systemic	36	2018
CEA	Metastatic colorectal cancer	NCT02959151	I/II	Vascular interventional therapy or intratumoral injection	20	2016
NKR-2	Unresectable liver metastasis of colorectal cancer	NCT03370198	I	Hepatic transarterial	18	2017
NKR-2	Potentially resectable liver metastasis of colorectal cancer	NCT03310008	I	Systemic	36	2017
MUC 1	Colorectal cancer	NCT02617134	I/II	Systemic	20	2015
HER2	Colorectal cancer	NCT02713984	I/II	Systemic	60	2016
CEA	Colorectal cancer	NCT02349724	I	Systemic	75	2015
CEA	Peritoneal metastases or malignant ascites of Colorectal cancer	NCT03682744	I	Intraperitoneal infusion	18	2018
C-MET	Colorectal cancer	NCT03638206	I/II	Systemic	73	2018
EpCAM	Colorectal cancer	NCT03013712	I/II	Vascular interventional therapy Endoscopy mediated infusion	60	2017
CD133	Colorectal cancer	NCT02541370	I/II	Systemic	20	2015
CEA	CEA + liver metastases from gastrointestinal tumors including colorectal cancer	NCT02850536	I	Hepatic transarterial Intrapancreatic retrograde venous infusion	5	2015
HER2	Colorectal cancer	NCT03740256	I	Systemic & Intratumoral	39	2018
CEA	CEA + adenocarcinoma with liver metastases from gastrointestinal tumors including colorectal cancer	NCT02416466	I	Hepatic transarterial administration	8	2015

4.2.2. Efecto de injerto contra leucemia

Este tipo de aproximación se usa para el tratamiento de leucemias. Aquí, se utilizan linfocitos T y células NK procedentes de un donante alogénico que inducirán una respuesta alogénica contra las células del receptor, incluidas las células leucémicas. Las células NK reconocerán a las células tumorales que expresen bajos niveles de moléculas MHC clase I. El problema de este tipo de tratamiento es el riesgo de producir enfermedad de injerto contra huésped, que atacaría a las células sanas del paciente, con graves consecuencias.

4.2.3. Anticuerpos antitumorales

El concepto del empleo de anticuerpos para tratar de manera selectiva diversas enfermedades, entre ellas el cáncer, surgió poco después del descubrimiento de los mismos a finales del siglo XIX. A lo largo de las décadas siguientes se intentó generar estos anticuerpos específicos, inmunizando animales, aunque con poco éxito. Finalmente, en 1975 Kohler y Milstein lograron desarrollar anticuerpos monoclonales (moAbs, *monoclonal antibodies*) a

partir de hibridomas (224), gracias a lo cual recibieron el premio Nobel de Medicina en 1984. El desarrollo de los anticuerpos monoclonales supuso un gran avance en la medicina ya que permitían no sólo tratar enfermedades, si no caracterizar subtipos celulares y desarrollar metodologías como la citometría de flujo, contribuyendo a su aplicación diagnóstica además de terapéutica.

Los primeros moAbs desarrollados eran murinos, pero su eficacia *in vivo* era limitada debido a su carácter inmunogénico que inducía reacciones alérgicas, anticuerpos anti-fármaco (ADA, *anti-drug antibodies*) y baja persistencia (225). Por ello, posteriormente se desarrollaron moAbs modificados para “humanizarlos”: primero los quiméricos, donde se fusionaban las regiones variables (Fab) murinas con las regiones constantes de un anticuerpo humano, aunque la inmunogenicidad continuaba siendo notable (226); después aparecieron los moAbs humanizados, donde sólo se modificaban las regiones determinantes de complementariedad (CDRs, *complementary determining regions*) (227); y finalmente se generaron los moAbs completamente humanos a partir de ratones transgénicos (228).

En 1986 fue aprobado primer moAb terapéutico: muromonab-CD3 en la prevención del rechazo agudo (229). Más de 3 décadas después de esta aprobación, el mercado de los moAbs ha ido creciendo exponencialmente. Actualmente existen más de 100 anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos tumorales, muchos de ellos ya aprobados para el tratamiento de diversos tumores (230). En lo referente al tratamiento del cáncer colorrectal, se han desarrollado

Estos anticuerpos, una vez reconocen las células tumorales, inducen la opsonización, fagocitosis, activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Entre los más conocidos es el uso de rituximab, un anticuerpo anti-CD20 utilizado exitosamente en el tratamiento del linfoma.

Uno de los problemas que surgieron al empezar a utilizar este tipo de terapias fue la aparición de anticuerpos anti-Ig que bloqueaban la unión del fármaco a su diana y favorecían su eliminación, repercutiendo negativamente en su eficacia clínica. Esto se debía a que los primeros anticuerpos monoclonales utilizados eran de origen murino, que inducían una respuesta inmunitaria contra la Ig murina. Actualmente este problema se ha reducido en gran medida gracias al empleo de anticuerpos monoclonales humanizados o humanos, elaborados mediante tecnología de ADN recombinante, en los cuales la fracción Fc, o el anticuerpo completo, es humano, reduciendo así su inmunogenicidad.

Otro de los problemas que plantea esta terapia es la aparición de clonas de células tumorales que no expresen el antígeno diana, debido a la presión ejercida por el sistema inmune al administrar estos anticuerpos. Una alternativa para evitarlo podría ser el empleo de combinaciones de varios anticuerpos con distintas especificidades.

Existe otro grupo de anticuerpos monoclonales muy utilizados que son aquellos dirigidos contra factores de crecimiento, en concreto aquellos dirigidos contra el factor de crecimiento epidérmico, utilizados en el tratamiento del cáncer colorrectal, o el VEGF, que promueve la angiogénesis, autorizado para el tratamiento de diversos tumores metastásicos.

5. Checkpoint inhibitors

El tratamiento convencional del cáncer se basaba en la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Posteriormente, aparecieron agentes dirigidos más selectivos contra las células tumorales (231,232). En la última década, los inhibidores del punto de control (ICIs, *immune checkpoint inhibitors*) han revolucionado el tratamiento del cáncer, obteniendo respuestas clínicas esperanzadoras en tumores hasta ahora considerados incurables (233). Aunque han mostrado eficacia en diversos cánceres con elevada carga mutacional, como melanoma o cáncer de pulmón, la mayoría de los pacientes no consiguen alcanzar una respuesta duradera (234). Además, en los cánceres con bajas tasas de mutaciones las respuestas a estas terapias han sido más limitadas.

Moléculas co-estimuladoras

Moléculas co-inhedoras

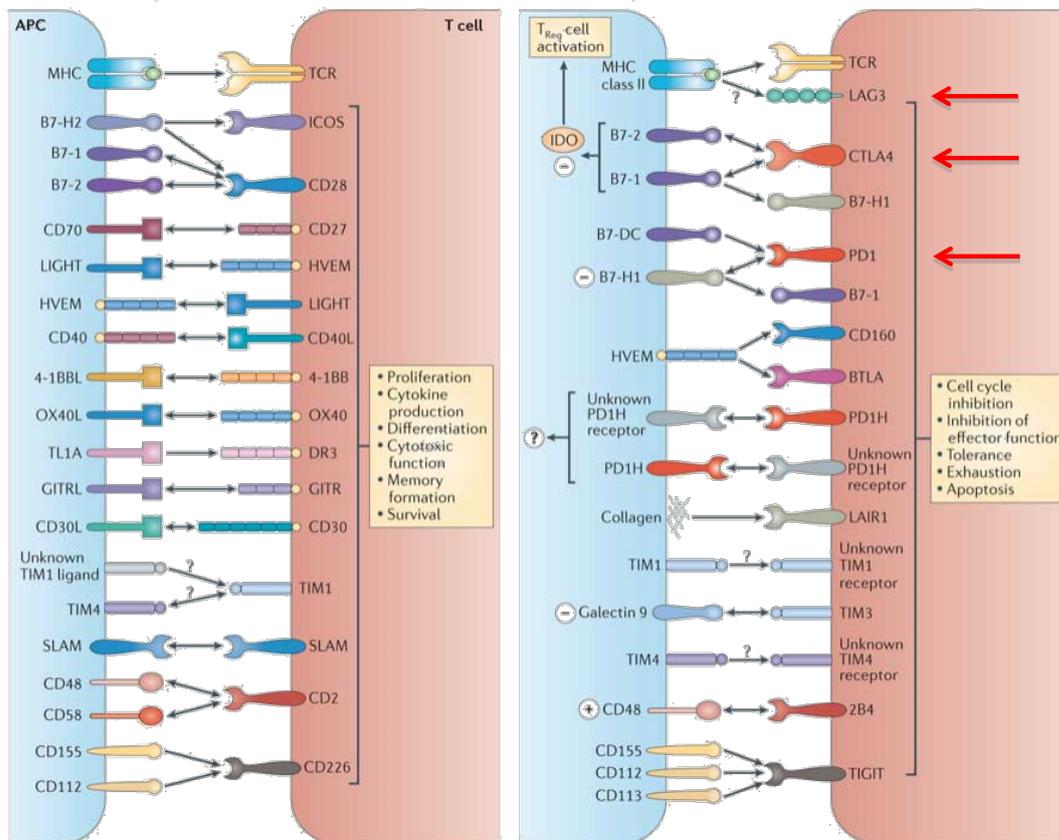


Figura I18. Principales puntos de control inmunológicos. Moléculas co-estimuladoras y co-inhedoras expresadas en los linfocitos T (en rojo) y sus correspondientes ligandos en las células presentadoras de antígenos (APC, en azul). Adaptado de (235).

Desde la aprobación de ipilimumab (ICI anti-CTLA-4) en 2011 para melanoma avanzado (236), el desarrollo de estos fármacos ha crecido exponencialmente, estudiándose numerosas moléculas implicadas en estos puntos de control (**figura I18**) y llevando a cabo ensayos clínicos en numerosos tumores. Hasta la fecha, los ICIs que han sido aprobados van dirigidos contra 3 moléculas inhibitorias: CTLA-4 (ipilimumab) (236), PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) (237,238) y PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) (239–241). Aunque inicialmente su indicación iba dirigida a estadios avanzados de la enfermedad, especialmente melanoma, actualmente los ICIs se han convertido en tratamientos de primera línea para varios tumores sólidos (233). Además de estos 3 principales ICIs ya aprobados, numerosas moléculas dirigidas contra otros puntos de control como LAG-3, TIM-3, TIGIT, B7H3, CD39, CD73 o CD47, entre otros, están siendo estudiadas.

El descubrimiento de la implicación de estos puntos de control del sistema inmune se lo debemos, en gran parte, a los estudios del Dr James Allison y Dr Tasaku Honjo respecto al papel inhibitorio sobre el linfocito T de las moléculas CTLA-4 (242) y PD-1 (243),

respectivamente. La relevancia de estos descubrimientos quedó reflejada con el premio Nobel de medicina con el que ambos fueron galardonados en 2018.

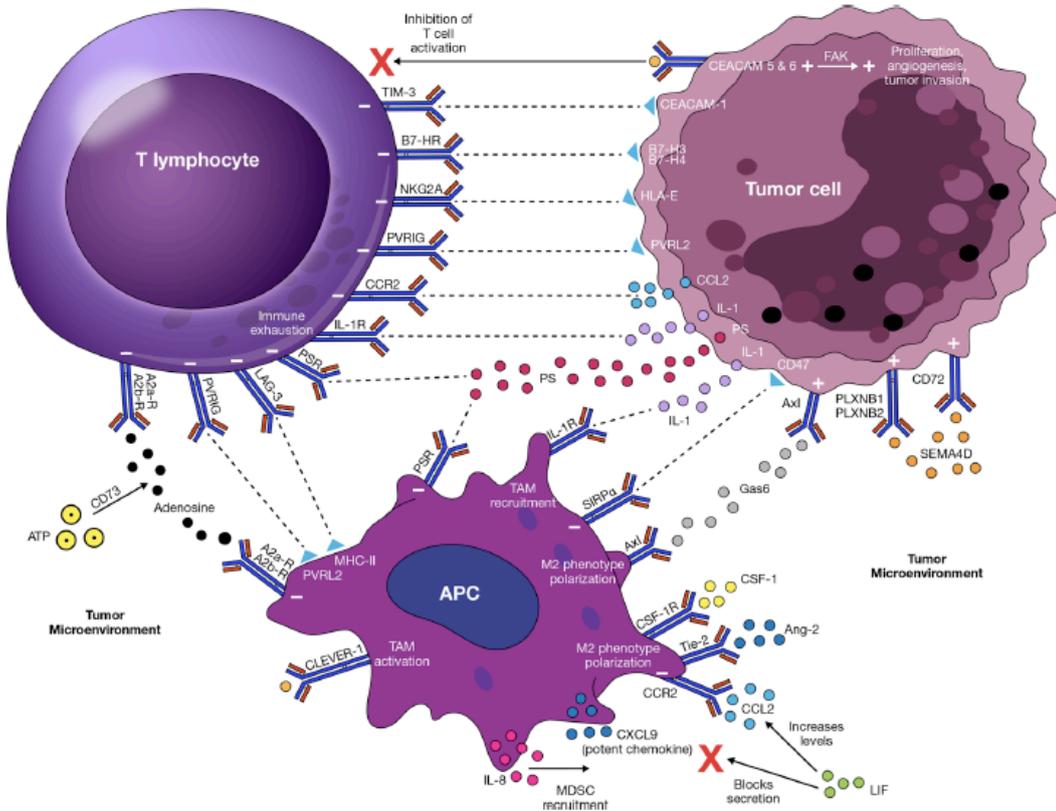


Figura I19. Mecanismos de acción de moléculas checkpoints inhibitorias y su efecto en células del sistema inmune y la progresión tumoral. Adaptado de (244).

En condiciones normales, las moléculas checkpoints regulan la respuesta inmune, controlando el balance entre las señales pro-inflamatorias y anti-inflamatorias que se producen tras una infección o daño. Esto es importante para mantener la homeostasis y evitar una sobre-estimulación del sistema inmune (245). Por lo general, estos mecanismos inhibitorios son en forma de ligando-receptor. Una vez que el linfocito T se ha activado tras haber reconocido un antígeno tumoral, presentado a través del MHC (246,247), la célula tumoral puede ser eliminada. Entonces, el linfocito T activado puede expresar en su superficie moléculas inhibitorias como CTLA-4 o PD-1 (245), que al unirse a sus respectivos ligandos, suprimirán el efecto del linfocito T. El problema es que las células tumorales se aprovechan de esta vía para romper este equilibrio y favorecer un ambiente inmunosupresor, inhibiendo la respuesta inmune de los linfocitos T y favoreciendo así el crecimiento del tumor (24). Estas moléculas pueden inhibir la actividad del sistema inmune a través de distintas vías (reclutando células supresoras como Treg o MDSC, bloqueando la secreción de citocinas inflamatorias, etc). Algunos ejemplos de estos posibles mecanismos inhibitorios y sus efectos sobre las funciones del linfocito T y la tumorigénesis están representados en la **figura I19**.

Inicialmente se conocían sólo unas pocas moléculas activadoras e inhibitoras que regulaban la interacción del linfocito T con las células presentadoras de antígenos y su consecuente activación (248). Según la hipótesis clásica de las dos señales, para activar al linfocito T es necesario un segundo estímulo tras el reconocimiento del antígeno (CD28-CD80/CD86). Cuando posteriormente se descubrió la molécula inhibitora CTLA-4, que interacciona con los mismos ligandos que CD28, esta hipótesis evolucionó hacia un sistema más complejo de regulación positiva y negativa (249). Mientras que CD28 se expresa de manera constitutiva en los linfocitos T, la expresión de CTLA-4 se induce una vez que el linfocito se ha activado, como mecanismo regulador para suprimir esta activación, junto con la *downregulación* de CD28 (250). En lo que respecta a los ligandos de estas moléculas, CD80 y CD86, su expresión en las células presentadoras de antígenos viene dada por el grado de maduración de las mismas, y aumenta en respuesta a distintos estímulos (251). De esta manera, podemos ver distintos puntos de control en la activación de la respuesta de los linfocitos T. En la **figura I20** podemos ver un esquema de estos mecanismos.

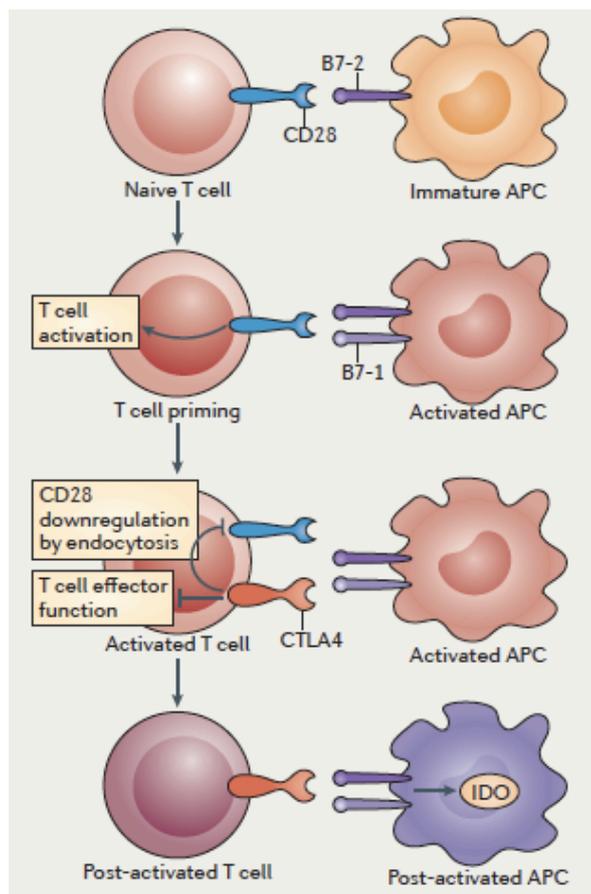


Figura I20. Sistema CD28-B7-CTLA-4. Adaptado de (235).

Esta teoría, aunque mostraba que la regulación de la activación de los linfocitos T es compleja, se centraba sólo en la interacción del linfocito con la célula presentadora de

antígeno. Dicha teoría ha ido evolucionando a lo largo del tiempo y actualmente se conocen muchas más moléculas, tanto co-estimuladoras como co-inhibidoras (ambas importantes en la regulación de la respuesta inmune y por tanto, puntos de control o *checkpoints*) que se expresan también en otras células que participan en el microambiente tumoral, no sólo en los linfocitos T y en las APCs. En la **figura I21** podemos ver un resumen de estas moléculas *checkpoints* y de sus interacciones entre los distintos participantes de la respuesta anti-tumoral.

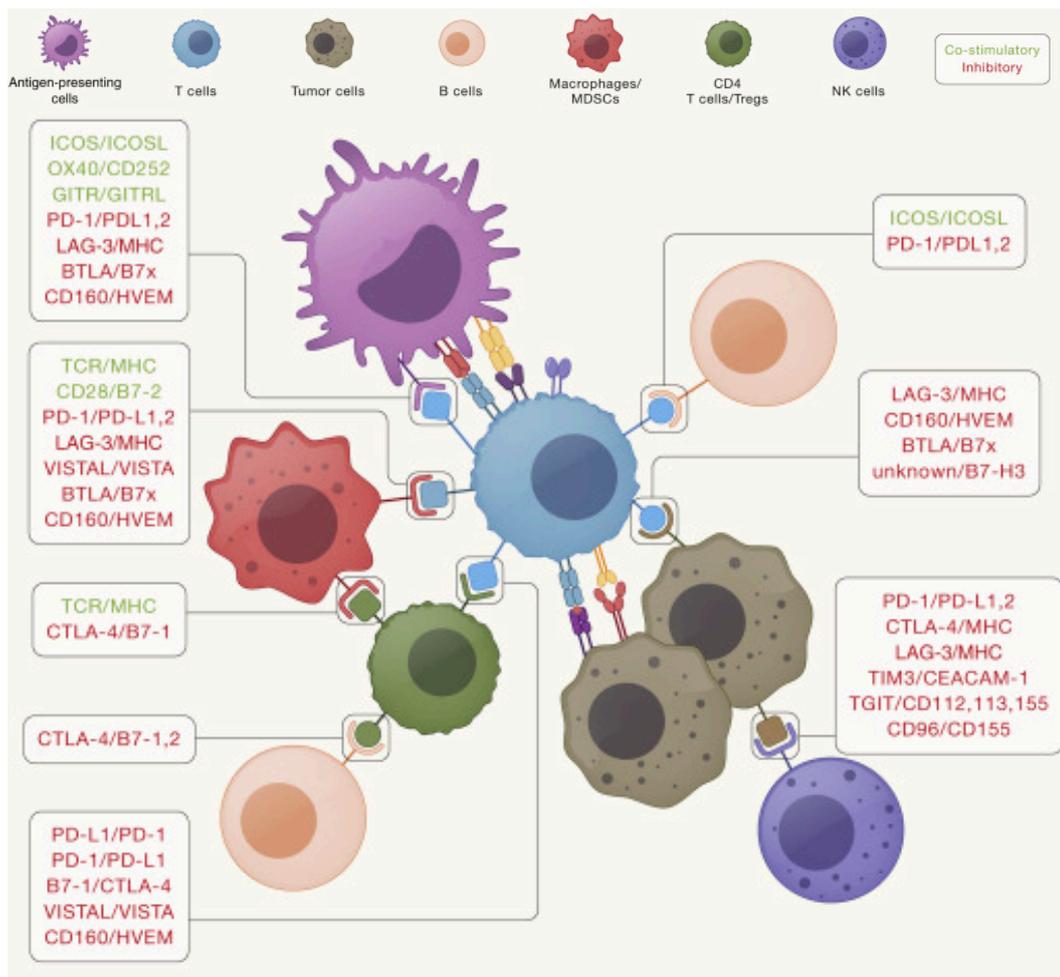


Figura I21. Checkpoints en el microambiente tumoral. Expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras en distintos tipos celulares (células presentadoras de antígenos, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, MDSCs, Tregs, NKs) implicados en la respuesta inmune antitumoral. Adaptado de (252).

El conocimiento de todas estas nuevas moléculas *checkpoints* ha permitido desarrollar numerosos fármacos dirigidos contra estas vías (ICIs) para el tratamiento de diversos tumores, que han aumentado de manera exponencial en los últimos años.

A pesar de los buenos resultados de esta terapia en distintos tumores avanzados, sólo una pequeña parte de los pacientes consiguen alcanzar unas respuestas completas duraderas

(253). Esto pone de manifiesto la existencia de distintos mecanismos de resistencia a esta terapia, tanto primaria como adquirida, ya que también se han observado grupos de pacientes que han recaído tras una buena respuesta inicial (254).

En cuanto a los mecanismos que influyen en la resistencia primaria, podríamos destacar factores como el estado de inmunosupresión del paciente (254); la baja expresión de neoantígenos tumorales (que se correlaciona con la carga mutacional del tumor) (255,256); alteraciones en la vía del INF- γ (257), la *downregulación* de moléculas de MHC (258), la baja expresión de las moléculas inhibitorias como PD-L1 en las células tumorales (259), el microbioma (260) o diversas propiedades epigenéticas de los tumores (261). A pesar de que los principales biomarcadores usados para predecir la eficacia de respuesta a los ICIs con la expresión de PD-L1 en el tumor o los niveles de carga mutacional, éstos tienen sus limitaciones y no siempre se correlacionan bien con la respuesta al tratamiento (259,262).

A diferencia de la resistencia primaria, los mecanismos causantes de la resistencia adquirida a los ICIs son menos conocidos. En este caso, muchos de los mecanismos implicados son los mismos que en la resistencia primaria, ya que ambos participan en el desarrollo y mantenimiento de una respuesta anti-tumoral efectiva (233). Los tumores van evolucionando y se seleccionan aquellas clonas que adquieren mutaciones en vías implicadas en la respuesta a los ICIs. Entre estas vías de resistencia adquirida estarían la pérdida de expresión de antígenos tumorales (263) o la alteración de la vía del INF- γ (264).

Además de todos estos factores característicos de microambiente tumoral, se han descrito otros fuera de este entorno que también pueden afectar a la eficacia de esta terapia. Algunos de ellos dependen del propio paciente, como la microbiota, los niveles hormonales, la activación del sistema inmune más allá del tumor u otras co-morbilidades. Pero más recientemente se ha destacado también la importancia de los factores externos, como el tipo de alimentación, el estilo de vida (ejercicio físico, consumo de alcohol o drogas), la exposición a distintos factores ambientales (contaminación, químicos, alérgenos), las condiciones psicológicas o sociales, etc (**figura I22**) (252).

El conocimiento acerca de todos estos mecanismos de resistencia a los ICIs todavía es muy limitado. Es necesario profundizar en este tema y conocer mejor los mecanismos de resistencia de que los tumores desarrollan frente a esta terapia para poder identificar vías alternativas con las que poder tratar a los pacientes de manera más efectiva.

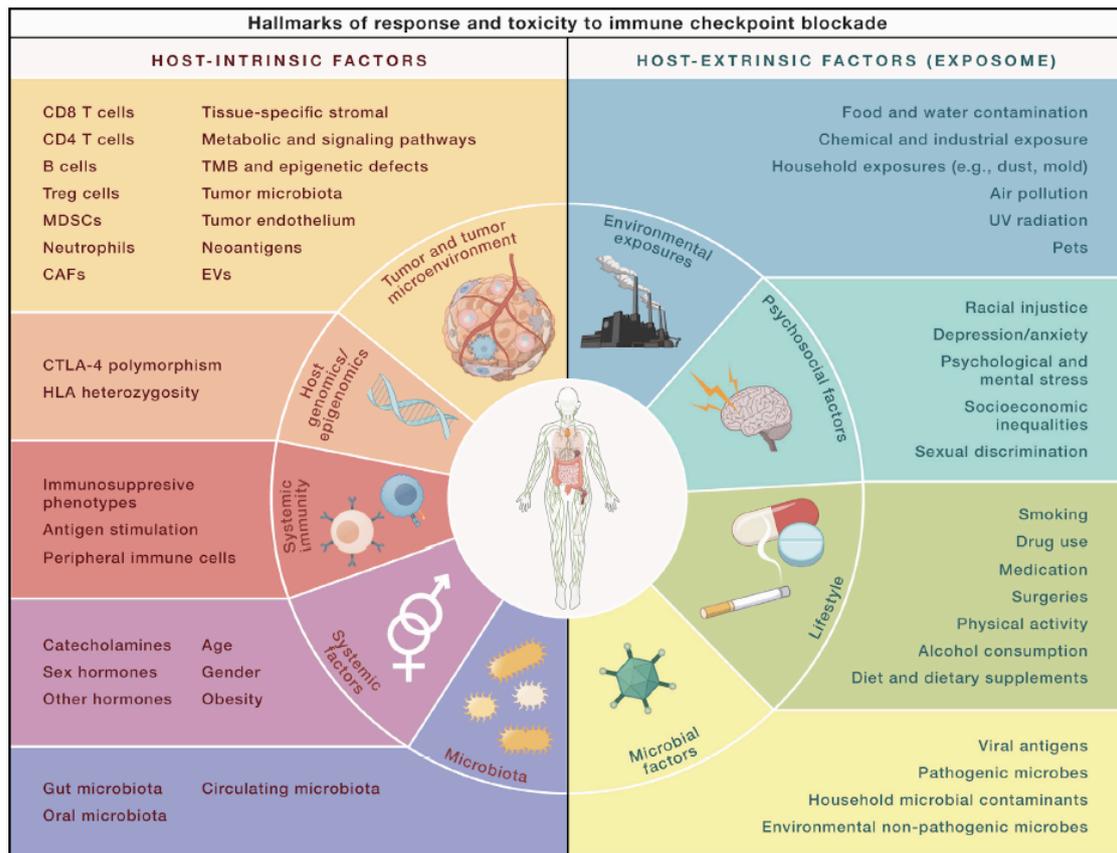


Figura I22. Factores que pueden influir en la eficacia de respuesta inmune anti-tumoral en el tratamiento con checkpoints. Los factores intrínsecos del paciente están representados a la izquierda, mientras que los factores externos se muestran a la derecha. Adaptado de (252).

5.1. Inhibidores de la vía PD-1/PD-L1

El receptor conocido como *programmed cell dead protein* (PD-1) se identificó por primera vez en 1992, asociándosele un papel en la regulación de la muerte celular programada (243). Se expresa en las células del sistema inmune activadas, como linfocitos T y B, células NK, macrófagos o células dendríticas (265). En los linfocitos T exhaustos este receptor también se encuentra muy sobre-expresado (266). Al interactuar con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), se produce una supresión de la respuesta inmune, ya que se inhibe la activación, la proliferación y la producción de citocinas de los linfocitos T (267). Estos ligandos se expresan en células presentadoras de antígenos, pero también en células tumorales (268), por ello esta vía es uno de los principales mecanismos de evasión antitumoral, siendo una candidata atractiva para utilizarse como diana terapéutica.

A pesar de que las funciones de PD-1 son similares a las de CTLA-4, ambos juegan un papel no redundante en la respuesta inmune. CTLA-4 se expresa al inicio de la activación de los linfocitos T, mientras que PD-1 lo hace en estadios más diferenciados; las vías a través de las

cuales suprimen la respuesta de linfocitos T son diferentes (aunque se solapan en algunos puntos, como la capacidad de PD-L1 para unirse a CD80, al igual que CTLA-4) (269); y los ligandos con los que interaccionan se expresan en diferente frecuencia en distintos tipos celulares (233). Estas diferencias en cuanto a sus mecanismos de acción también se han evidenciado tras el uso de los fármacos bloqueantes de ambas vías y os observar, tanto en estudios pre-clínicos como en pacientes, que el perfil de toxicidad en ambos casos también mostraba disparidades. Los ICIs de la vía PD-1/PD-L1 suelen generar menos efectos adversos que aquellos que bloquean la vía CTLA-4 (270). Este mejor perfil de seguridad probablemente se deba a que las moléculas PD-1/PD-L1 se expresan en gran cantidad en los linfocitos que infiltran el tumor y las células tumorales (252), mientras que CTLA-4 está implicado en la regulación de la respuesta de los linfocitos T frente a los antígenos propios (271,272).

En diversos estudios en animales se evidenció la importancia de esta vía en la supresión de la respuesta inmune, así como su capacidad para ser suprimida con distintos bloqueantes (273,274), lo que dio lugar al desarrollo de los primeros fármacos bloqueantes de esta vía tiene en 2001. Posteriormente, a partir de 2006 se iniciaron numerosos ensayos clínicos para demostrar la eficacia de distintos bloqueantes de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en diversos tumores. Los primeros ensayos, desarrollados en pacientes con melanoma avanzado, demostraron una potente capacidad anti-tumoral y duradera, con una toxicidad limitada, en ciertos grupos de pacientes (275,276).

Posteriormente, estos ensayos se ampliaron a otros tumores, demostrando también eficacia en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña (277), carcinoma renal, o cáncer colorrectal (278). Gracias a los buenos resultados clínicos observados, en 2014 la FDA aprobó los primeros anticuerpos bloqueantes de PD-1 (279), nivolumab y pembrolizumab, para el tratamiento de melanoma avanzado en pacientes refractarios al bloqueante de CTLA-4 ipilimumab. Posteriormente, esta aprobación se amplió al tratamiento de otros tumores, el primero fue el cáncer de pulmón (280), seguido de muchos otros tumores sólidos como el urotelial, de cabeza y cuello, renal, gástrico y tumores hematológicos como el linfoma de Hodgkin (233). Además, desde 2017 el uso de estos fármacos se amplió notablemente gracias a la aprobación de pembrolizumab para cualquier tumor sólido metastásico y avanzado que exprese MSI-H o dMMR (281). Asimismo, se han desarrollado otros inhibidores de esta vía, dirigidos contra los ligandos de PD-1, como los bloqueantes de PD-L1 atezolizumab, durvalumab o avelumab, que también se están estudiando en diversos ensayos y han conseguido ser aprobados para ciertos tipos de tumores (282). En la **tabla I4** se puede ver un

resumen de los fármacos que inhiben esta vía y los distintos tumores sólidos y hematológicos para los cuales tienen indicación aprobada actualmente.

Tabla 14. Fármacos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 aprobados.

Fármaco	Aprobación	SC	NSCLC	SCLC	RCC	HL	HNC	UC	CRC	HCC	ESC	MPM	GC	GEJC	TNBC	BC	CC	EC
Nivolumab	2014	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-
Pembrolizumab	2014	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cemiplimab	2018	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toripalimab	2018	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sintilimab	2018	-	✓	-	-	✓	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-
Camrelizumab	2018	-	✓	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Tislelizumab	2019	-	✓	-	-	✓	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zimberelimab	2021	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prolgolimab	2020	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dostarlimab	2021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
Atezolizumab	2016	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓	-	-	-	-	✓	-	-	-
Durvalumab	2017	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-
Avelumab	2017	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SC, *skin cáncer*; NSCLC, *non-small cell lung cáncer*; RCC, *renal cell carcinoma*; HL, *Hodgkin lymphoma*; HNC *head and neck cancer*; UC *urothelial carcinoma*; CRC *colorectal cancer*; HCC, *hepatocellular carcinoma*; ESC, *esophageal carcinoma*; MPM, *malignant pleural mesothelioma*; GC, *gastric cancer*; GEJC, *gastroesophageal junction cancer*; TNBC, *triple-negative breast cancer*; BC, *bladder cancer*; CC, *cervical cáncer*; EC, *endometrial cáncer*. Adaptado de (283).

Pese a la gran esperanza que han supuesto los fármacos bloqueantes de la vía PD-1/PD-L1, y los distintos fármacos ya aprobados para numerosos tipos de tumores, esta alternativa terapéutica todavía tiene muchas limitaciones. La mayoría de los pacientes no responden a esta terapia, y de entre estos respondedores, la terapia no es duradera y un elevado porcentaje se vuelve refractario al cabo del tiempo. En cuanto a los efectos adversos, aunque suelen ser menos tóxicos comparados con los bloqueantes de CTLA-4, todavía suponen un riesgo considerable y en algunos casos estas toxicidades pueden ser potencialmente graves e incluso comprometer la vida del paciente.

En el grupo de pacientes no respondedores a esta terapia, parece que la vía PD-1/PD-L1 no es el actor principal en la resistencia a la inmunidad antitumoral. Otros mecanismos, como la sobre-expresión de *checkpoints* adicionales, la presencia de otras células inmunosupresoras, la liberación de citocinas inhibitorias, la remodelación de las estructuras celulares o la angiogénesis, juegan un papel importante en la modulación de la respuesta antitumoral (284–286). Terapias dirigidas contra estos otros mecanismos inmunosupresores podrían favorecer el efecto del bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 para una erradicación tumoral más eficaz. Asimismo,

existen factores que pueden contribuir positivamente a la erradicación de los tumores, y que podemos potenciar para diseñar estrategias de tratamiento más efectivas, como la muerte celular inmunogénica, las citocinas anti-tumorales o la activación de la presentación antigénica (283).

Estas vías alternativas de modulación de la respuesta inmune anti-tumoral, unidas al éxito que han supuesto los inhibidores de esta vía PD-1/PD-L1, ha hecho que, además de los ensayos clínicos en monoterapia, se estén desarrollando numerosos ensayos clínicos que combinan

estos inhibidores junto con otras terapias. Dentro de estas combinaciones se incluyen las terapias tradicionales (quimio o radioterapia), los agentes anti-angiogénicos (anti-VEGF), otros ICIs (CTLA4, TIM-3, LAG-3), diversas terapias dirigidas (contra EGFR, ALK, MEK, RAS) o terapia celular adoptiva (DCs, CARTs), entre otros. (figura I23).

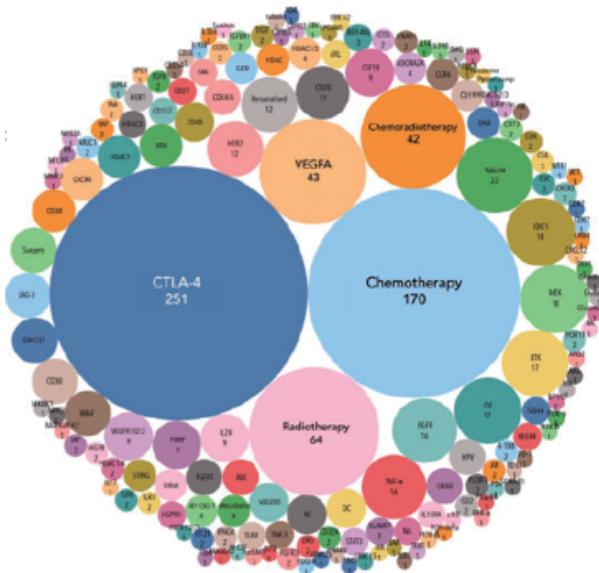


Figura I23. Ensayos que combinan anti-PD1-PD-L1 con otras terapias. Adaptado de (287).

En cuanto al avelumab, se trata de un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1 dirigido contra PD-L1 que contiene un Fc nativo capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en las células NKs, lo cual genera una actividad antitumoral por vía tanto innata como adaptativa. Este Fc lo diferencia de otros anticuerpos bloqueantes de PD-L1, como atezolizumab y durvalumab, que tienen su Fc modificado y no generan esta citotoxicidad (282). Avelumab está indicado en monoterapia para el tratamiento de carcinoma metastásico de células de Merkel y el urotelial, y en combinación con axitinib para el tratamiento del carcinoma avanzado de células renales. Además de estas indicaciones aprobadas, su uso se está estudiando en el tratamiento de distintos tumores, en monoterapia y en combinación con otros fármacos.

5.2. Checkpoints inhibitors en cáncer colorrectal

La revolución del tratamiento antitumoral utilizando inhibidores de *checkpoints* también ha llegado al cáncer colorrectal. Sin embargo, un bajo porcentaje de los pacientes con este tipo de

tumor se benefician de estos tratamientos. En el caso de los tumores con alta inestabilidad de microsatélites (*microsatellite instability*, MSI) o deficiencia en los mecanismos de reparación (*deficient mismatch repair*, dMMR), este tipo de terapia ha logrado respuestas completas y duraderas. De hecho, gracias a los buenos resultados obtenidos en diversos ensayos clínicos, en este subtipo de cáncer colorrectal MSI/dMMR están aprobados el uso de pembrolizumab (anti-PD-1) en primera línea, nivolumab (anti-PD-1) en segunda línea y la combinación de ipilimumab (anti-CTLA-4) con nivolumab en tercera línea (252), los cuales han mostrado unas tasas de respuesta global del 44%, 31% y 55% respectivamente (252). A pesar de ello, los tumores de tipo MSI/dMMR representan tan sólo el 3-5% del cáncer colorrectal metastásico y un 14% del total de tumores de tipo colorrectal. Por tanto, la gran mayoría de los pacientes con cáncer colorrectal, que son de tipo MSS/pMMR (estabilidad de microsatélites, *microsatellite stability*, MSS y *proficient mismatch repair*, pMMR) no se benefician de este tipo de terapia.

Esta diferencia de efectividad entre tumores MSI/dMMR *versus* tumores MSS/pMMR no se circunscribe sólo a los tumores colorrectales, si no que se había observado en distintos tipos de cánceres (288,289). Tras los estudios previos en melanoma o cáncer de pulmón, en 2015 se publicó un estudio (256) en el que demostraban por primera vez estas diferencias de respuesta a los ICIs en función del subtipo de cáncer colorrectal. En dicho estudio, se compararon 2 grupos de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, MSS vs MSI, (además de un grupo con cáncer MSI de tipo no colorrectal) que recibieron tratamiento con pembrolizumab. Como puede verse en las gráficas de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de progresión (PFS) de la **figura 124**, las tasas de respuesta global al tratamiento fueron mayores en el grupo de pacientes con tumores de tipo MSI (40% vs 0%), observándose una gran diferencia tanto en la supervivencia libre de progresión como en la supervivencia global.

Esta gran diferencia de respuesta podría deberse a que los tumores de tipo dMMR tienen una tasa de mutaciones somáticas mucho más elevada que los de tipo pMMR (290), lo cual hace que se generen más posibles neoantígenos y que estos sean reconocidos por el sistema inmune, de ahí la mayor infiltración linfocitaria observada en los tumores de tipo dMMR (291). El hecho de que estos tumores altamente infiltrados muestren también una elevada expresión de moléculas inhibitoras (PD-1, CTLA-4, LAG-3) confirma la hipótesis de que los tumores de tipo dMMR son capaces de generar una potente estimulación del sistema inmune (son más inmunogénicos), pero dicha estimulación se ve contrarrestada con las moléculas inhibitoras que frenan la eliminación del tumor. A pesar de ello, son tumores con un microambiente immuno-*hot*, y por tanto buenos candidatos a recibir tratamientos con inmunoterapia.

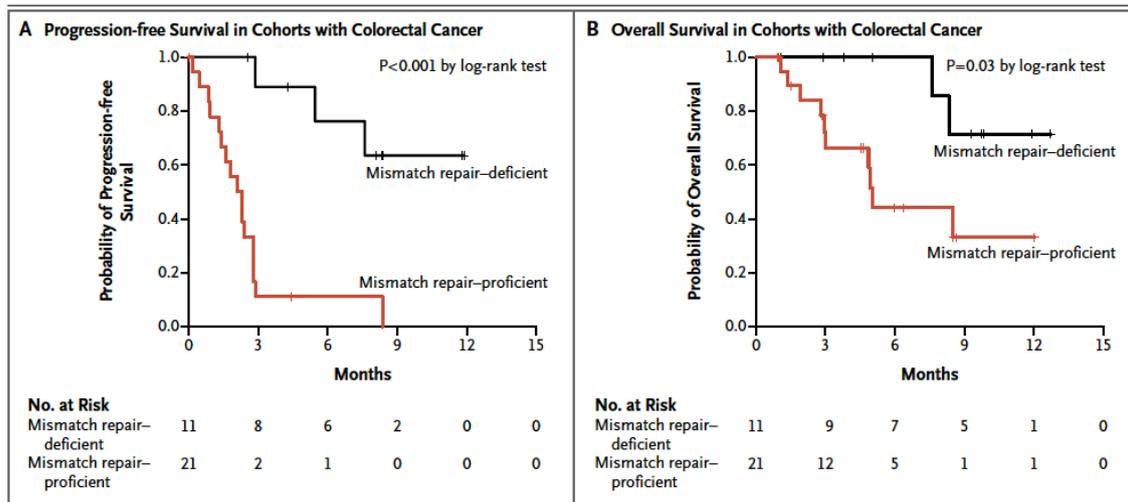


Figura I24. Beneficio clínico de pembrolizumab en función del estatus dMMR (deficient mismatch repair) o pMMR (proficient mismatch repair). Las curvas de Kaplan-Meier muestran la PFS (A) y la OS (B) en pacientes con cáncer colorrectal. Adpatado del estudio (256).

Este estudio, junto con otros posteriores (292), muestran que el estatus de MMR puede emplearse para predecir la respuesta al tratamiento con ICIs. Sin embargo, puede excluir a pacientes que tienen tumores de tipo pMMR y que podrían beneficiarse de esta terapia, ya que no tiene en cuenta otros factores que también pueden afectar a la respuesta de estos tratamientos. Como ejemplo, un caso clínico en el que reportaban una respuesta a la terapia con pembrolizumab en un paciente con mCCR de tipo MSS (293). La particularidad de este paciente es que, a pesar de tener un fenotipo MSS, tiene una mutación en POLE (polimerasa ϵ). Las mutaciones en esta polimerasa generan en una alta tasa de mutaciones, lo que se traduce en un tumor con una alta TMB (*tumor mutational burden*) y muy inmunogénico, a pesar de ser un fenotipo MSS. Este caso pone de manifiesto la importancia de tener en cuenta otros factores, más allá del estatus MMR del tumor, para predecir la eficacia al tratamiento con ICIs. En la **tabla 15** están recogidos algunos biomarcadores a tener en cuenta para seleccionar pacientes con CCR que puedan beneficiarse de la terapia con ICIs, más allá del estatus MSI/MSS (294).

Tabla 15. Biomarcadores para seleccionar pacientes con cáncer colorrectal candidatos a tratamiento con *checkpoint inhibitors*. Adaptado de (294).

Population	Biomarker	Outcomes
dMMR	High frameshift mutation load	Associated with response and PFS
	High TMB	Associated with response and OS
	MSI sensor score	Associated with response and OS
	<i>RAS</i> and <i>BRAF</i> mutations	Not associated with resistance or benefit
	Germline MMR mutations	Not associated with resistance or benefit
	JAK mutations	Associated with resistance?
	HLA class I and <i>B2M</i> mutations	Controversial, not associated with outcome
	Immunoscore [®] , immune profile	Higher CD8 infiltration associated with better response
pMMR	High blood TMB	Associated with better survival
	PD-L1	No benefit associated with PD-L1 expression by tumor cells
	Immunoscore [®]	No data
	CMS classification	No data

B2M beta-2-microglobulin, *CMS* consensus molecular subtype, *dMMR* mismatch repair-deficient, *OS* overall survival, *PFS* progression-free survival, *pMMR* mismatch repair-proficient, *TMB* tumor mutation burden

Más allá de las terapias actualmente aprobadas, en la **tabla 16** están recogidos los ensayos clínicos en los cuales se están estudiando distintos ICIs para el tratamiento de cáncer colorrectal avanzado (de cualquier tipo, MSS o MSI). En la mayoría de ellos, se trata de ensayos que incluyen pacientes con cualquier tipo de tumor sólido en estadio avanzado (no son específicos del CCR) y algunos de ellos sólo incluyen tumores con alta carga mutacional, como los de tipo MSI, lo que pone de manifiesto las limitadas opciones terapéuticas en este campo dirigidas hacia tumores colorrectales MSS.

Tabla 16. Ensayos clínicos con *checkpoints inhibitors* en cáncer colorrectal. Adaptado de (244).

Ensayo clínico	Fase	Molécula diana	Agente
NCT02563002	III	PD-1	PEMBROLIZUMAB
NCT03084471	III	PD-L1	DURVALUMAB
NCT02460224	I/II	LAG-3	LAG525(IMP701)
NCT03005782	I	LAG-3	REGN3767 (R3767)
NCT03156114, NCT03433898, NCT03780725	I	LAG-3	BI 754,091
NCT03697304, NCT03219268	I	LAG-3	Tebotelimab (MGD013)
NCT03252938	I	LAG-3	Eftilagimod alpha (IMP321)
NCT03440437	I	TIM-3	FS118
NCT02608268	I/II	TIM-3	MBG453
NCT03489343	I	TIM-3	Sym023
NCT02817633	I	TIM-3	TSR-022
NCT03729596	I/II	B7-H3 and B7-H4	MGC018
NCT02740985	I	A2aR	EOS100850
NCT03719326, NCT03720678, NCT03629756	I	A2aR	AB928
NCT03454451	I	CD73	CPI-006
NCT03667716	I	PVRIG/ PVRL2	COM701

Ya hemos hablado en el apartado anterior que, para potenciar el efecto inmunoestimulante de los ICIs, se están explorando muchas terapias combinadas de ICIs con diversos fármacos. Las terapias elegidas para combinar junto con los ICIs son muy variadas, desde la radioterapia,

pasando por inhibidores de la angiogénesis y otras terapias dirigidas como los bloqueantes de distintas tirosin kinasas (EGFR, MEL, AL), así como la combinación de distintos tipos de ICIs con los bloqueantes de la vía PD-1/PD-L1. En la siguiente **tabla 17** se resumen dichos ensayos de terapia combinada en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.

Tabla 17. Terapia anti-PD1/PDL1 en combinación en cáncer colorrectal. Adaptado de (283).

Ensayo clínico	Fase	anti-PD1/PDL1	Terapia combinada (diana)
NCT02608385	I	Pembrolizumab	Radiotherapy
NCT02383212	I	Cemiplimab	Radiotherapy
NCT02501096	I/II	Pembrolizumab	Lenvatinib (VEGFR)
NCT02060188	II	Nivolumab	Ipilimumab (CTLA4)
NCT02870920	II	Durvalumab	Tremelimumab (CTLA4)
NCT03099109, NCT02791334	I	LY3300054	LY3321367 (TIM-3)
NCT02608268	I/II	Spartalizumab	Sabatolimab (TIM-3)
NCT03667716	I	Nivolumab	COM701 (PVRIG)
NCT02179918	I	Pembrolizumab	PF-05082566 (4-1BB)
NCT03829501	I/II	Atezolizumab	KY1044 (ICOS)
NCT02740270	I	Spartalizumab	Spartalizumab
NCT02660034	I	Tislelizumab	Pamiparib (PARP)
NCT02484404	I/II	Durvalumab	Olaparib (PARP)
NCT01988896	I	Atezolizumab	Cobimetinib (MEK)
NCT02788279	III	Atezolizumab	Cobimetinib (MEK)
NCT02972034	I	Pembrolizumab	MK-8353 (ERK)
NCT04017650	I/II	Nivolumab	Encorafenib (RAF) and Cetuximab (EGFR)
NCT03502733	I	Nivolumab	Copanlisib (PI3K)
NCT02393248	I/II	Pembrolizumab	Pemigatinib (FGFR)
NCT04000529	I	Spartalizumab	TNO155 (SHP-2)

Actualmente no existe ningún inhibidor de *checkpoints* aprobado para el cáncer colorrectal de tipo MSS, ya que no han demostrado eficacia suficiente, y hemos visto que muchos ensayos se centran en los pacientes con tumores de tipo MSI/dMMR. Sin embargo, a pesar de que los resultados iniciales no han sido tan buenos como los observados para el CCR de tipo MSI, sí que existen múltiples ensayos que están explorando este campo. Estos se centran en transformar el microambiente tumoral poco inmunogénico de los tumores MSS, poco infiltrado y con mayor porcentaje de células supresoras como Treg, MDSC o macrófagos (que puede verse representado en la **figura 125** en comparación con el microambiente de los tumores MSI).

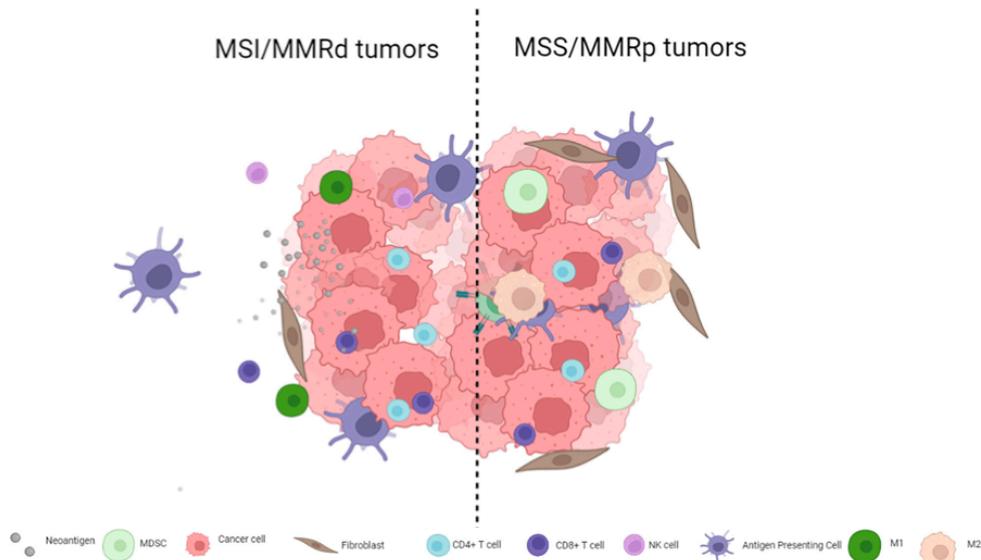


Figura I25. Diferencias en la infiltración inmune del microambiente tumoral en los tumores de tipo MSS y MSI colorrectal. Adaptado de (295).

Los resultados de estos ensayos clínicos completados con ICIs que incluyen pacientes con CCR de tipo MSS se recogen en la **tabla I8**. Aunque los beneficios clínicos observados son en su mayoría limitados, hay algunos resultados prometedores. La mayoría usan terapia combinada con otro tipo de tratamientos que intentan aumentar la inmunogenicidad del tumor (como radioterapia o terapias dirigidas), para transformar el ambiente inmuno-*cold* y hacerlo más fácilmente reconocible por el sistema inmune. Además de las combinaciones clásicas muy utilizadas en otros ensayos, como quimioterapia, radioterapia o inhibidores selectivos (MEK, EGFR, tirosin kinasas), también se explora el uso de anticuerpos biespecíficos o la terapia celular adpotiva.

Tabla I8. Ensayos clínicos completados con checkpoints en cáncer colorrectal de tipo MSS. Adaptado de (295). (página siguiente).

Immunoterapia del cáncer colorrectal con anti-PD-L1 y células dendríticas

STRATEGY	STUDY	PHASE	SETTING	TREATMENT	SAMPLE SIZE	ORR (%)	PFS (MONTHS)	OS (MONTHS)
Immunotherapy	Keynote-016 NCT01876511	II	Refractory	Pembrolizumab	18	0	2.2	5
	CheckMate-142 NCT02060188	II	First-line	Nivolumab-Ipilimumab	23	NA	1.4	NA
	CCTC-CO.26 NCT02870920	II	Refractory	Durvalumab-Tremelimumab/BSC	119/61	0.5/0	1.8/1.9	6.6/4.1
	NCT02720068	I	Refractory	Pembrolizumab-Favelizumab	80	6.3	2.1	NA
	C-800 NCT03860272	IBI	Refractory	Botenlimab-Balstilimab	41	24	NA	NA
	NCT03156114	I	Refractory	BI754111-BI754091	40	7.5	NA	NA
	Imblaze-370 NCT02788279	III	Refractory	Atezolizumab	90	2	1.9	7.1
MEK inhibitors + ICI	Imblaze-370 NCT02788279	III	Refractory	Atezolizumab-Cobimetinib	183	3	1.9	8.9
Tyrosine kinase inhibitors + ICI	REGONIVO NCT03406871	Ib	Refractory	Regorafenib-Nivolumab	24	33	7.9	NR
	NCT03712943	Ib	Refractory	Regorafenib-Nivolumab	52	8	4.3	11.1
	NCT04126733	II	Refractory	Regorafenib-Nivolumab	70	7	1.8	12
	NCT03657641	I/II	Refractory	Regorafenib-Pembrolizumab	73	0	2	10.9
	REGOMUNE NCT03475953	II	Refractory	Regorafenib-Avelumab	48	0	3.6	10.8
	NCT04362839	I	Refractory	Regorafenib-Ipilimumab-Nivolumab	29	31	4	19.6
	CAMILLA NCT03539822	II	Refractory	Cabozantinib-Durvalumab	36	28	4.4	9.1
	COSMIC-021 NCT03170960	Ib	Refractory	Cabozantinib-Atezolizumab	31	9.7	3	14
	NCT03332498	I/II	Refractory	Ibrutinib-Pembrolizumab	40	0	1.4	6.6
	LEAP-005 NCT03797326	II	Refractory	Lenvatinib-Pembrolizumab	32	22	2.3	7.5
EGFR inhibitors + ICI	SWOG2107 NCT04017650	I/II	Refractory	Nivolumab-Encorafenib-cetuximab	26	45	7.3	11.4
	LCCC1632 NCT03442569	II	Refractory	Nivolumab-Ipilimumab-Panitumumab	56	5	5.7	NA
	CAVE NCT04561336	II	Refractory	Avelumab-Cetuximab	71	8.5	3.6	11.6
	AVETUX NCT03174405	II	First-line	FOLFOX-Cetuximab-Avelumab	43	79.5	11.5	NA
Chemotherapy + ICI	AtezotRIBE NCT03721653	III	First-line	Atezolizumab-FOLFOXIRI-Bevacizumab/ FOLFOXIRI-Bevacizumab	132/67	59/64	12.9/11.4	NA
	BACCI NCT02873195	II	Refractory	Atezolizumab-Capectabine-Bevacizumab/ Capectabine-Bevacizumab	82	10/5	5/3.3	10.3/10.2
	CHECKMATE-9X8 NCT03414983	II	First-line	FOLFOX-Bevacizumab-Nivolumab vs FOLFOX-Bevacizumab	157/68	60/46	11.9/11.9	29.2/NR
	MAYA NCT03832621	II	Refractory	Temozolomide + Nivolumab + ipilimumab	33	45	7	18.4
	MEDITREME NCT03202758	II	First-line	FOLFOX-Durvalumab-Tremelimumab	57	61	8.4	NA
	MODUL NCT02291289	II	First-line	FOLFOX-Bevacizumab-Atezolizumab/ FOLFOX-Bevacizumab	297/148	NA	7.2/7.4	22/22
	Bispecific antibodies	NCT02324257	I	Refractory	Cibisatamab	68	6	NA
NCT02650713		I	Refractory	Cibisatamab-Atezolizumab	38	12	NA	NA
Radiotherapy	NCT03122509	II	Refractory	Radiotherapy + Durvalumab + Tremelimumab	24	8.3	1.8	11.4
	NCT03104439	II	Refractory	Radiotherapy + Nivolumab + Ipilimumab	40	12.5	NA	NA
Vaccines	NCT01413295	II	Refractory	Dendritic cell vaccine/ BSC	28/24	0/0	2.7/2.3	6.2/4.7
	FXV	II	First-line	HLA-A*2402-restricted peptides+ oxaliplatin-based chemotherapy	50 HLA-A*2402-matched/46 HLA-A*2402-unmatched	62/60.9	7.2/8.7	20.7/24
Intratumoral	NCT00149396	I/II	Refractory	NV1020 hepatic artery infusion + chemotherapy	22	4.5	6.4	11.8

A pesar de que el beneficio clínico mostrado en la mayoría de estos ensayos ha sido menor del esperado, continúan los esfuerzos por desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. En la **tabla 19** se recogen los nuevos ensayos clínicos en marcha que exploran estas alternativas en mCCR MSS.

Tabla 19. Nuevos ensayos clínicos en cáncer colorrectal metastásico MSS. Adaptado de (295).

Strategy	Study ID	Phase	Setting	Treatment combination
Immunotherapy plus tyrosine kinase inhibitors	NCT03539822	II	refractory	Cabozantinib-durvalumab
	NCT04776148	III	refractory	Pembrolizumab-lenvatinib
	NCT04776148	II	refractory	Lenvatinib-durvalumab
Immunotherapy plus chemotherapy	NCT04068610	Ib/II	first line	FOLFOX-bevacizumab+/-durvalumab-oleclumab
	NCT04262687	II	first line	Pembrolizumab-CAPOX-bevacizumab
	AVETRIC NCT04513951	II	first line	FOLFOXIRI-avelumab-cetuximab
	ARETHUSA NCT03519412	II	refractory	Temozolomide then pembrolizumab
	NIVACOR NCT04072198	II	first-line	FOLFOXIRI-bevacizumab-nivolumab
Immunotherapy plus anti-EGFR	NCT03442569	II	first line	Nivolumab-ipilimumab-panitumumab
Immunotherapy plus PI3CA inhibitor	NCT03177058	I/II	refractory	Nivolumab-copanlisib
Immunotherapy plus anti-LAG3	NCT03642067	II	refractory	Relatlimab-nivolumab
Immunotherapy plus WNT/ β -catenin inhibitor	NCT02675946	I	refractory	CGX1321-pembrolizumab
	NCT04907539	II	refractory	RXC004 +/- Nivolumab
Immunotherapy plus TGF- β inhibitor	NCT04952753	II	second-line	NIS793-chemotherapy
Immunotherapy combinations	NCT03860272	I	refractory	Botenslimab-balstilimab
Immunotherapy plus radiotherapy	NCT029929112	II	refractory	Atezolizumab-radiotherapy
	NCT02437071	II	refractory	Pembrolizumab-radiotherapy
Immunotherapy plus MAPK inhibitor	CodeBreaK 100 NCT03600883	I/II	refractory	AMG510+/-Anti-PD1/anti-PD-L1
	NCT04017650	II	refractory	Encorafenib-cetuximab-nivolumab
	NCT04699188	I/II	refractory	JDQ443+/-TNO155+/-spartalizumab
	NCT03668431	II	refractory	Dabrafenib-trametinib-spartalizumab
Bispecific antibodies	NCT04826003	I	refractory	RO712290-cibisatamab-obinutuzimab
	NCT04468607	I	refractory	BLYG8824A

En vista de todos estos resultados, son necesarios estudios más extensos para confirmar algunos de los resultados prometedores, en cohortes más amplias y con un mayor período de seguimiento, así como seguir profundizando en los mecanismos de resistencia a esta terapia y en la búsqueda de biomarcadores más eficaces en la selección de pacientes.

6. Vacunas de células dendríticas

Como ya se ha mencionado en el apartado 4, la inmunoterapia persigue modular el sistema inmune para potenciar la respuesta citotóxica antitumoral y lograr la erradicación del tumor. Entre las opciones de inmunoterapia disponibles están las vacunas de células dendríticas. Ésta es un tipo de inmunoterapia activa, capaz de estimular directamente a los linfocitos T.

Hay varias características de las células dendríticas que las convierten en una herramienta ideal para su uso terapéutico como inmunoterapia antitumoral. Son células ampliamente

distribuidas por el organismo, con capacidad migratoria, y que actúan de nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa, siendo capaces de activar no sólo la respuesta inmune humoral o celular, si no también a células NKs (296). Son las células presentadoras de antígenos más potentes, capturando antígenos exógenos para presentarlos no sólo a los linfocitos CD4 si no también a los CD8. Esta presentación cruzada, que presenta péptidos exógenos a los linfocitos CD8 a través del MHC-I, es un mecanismo muy importante en la respuesta inmune antitumoral, ya que genera respuestas más potentes y duraderas (20).

Tal y como ya se ha comentado en apartados anteriores, algunos de los mecanismos de escape tumoral están relacionados con problemas en la presentación antigénica (falta de antígenos tumorales, falta de expresión de moléculas del MHC, problemas en la maquinaria de presentación de antígenos o falta de estímulos co-estimuladores (por falta de moléculas co-estimuladoras o por exceso de moléculas co-inhibidoras) necesarios para una eficiente activación del linfocito T (20). Es por ello que, utilizar una terapia que favorezca una presentación antigénica más eficaz, es una alternativa atractiva para potenciar la inmunidad antitumoral. En la **figura 126** vemos representado un esquema de la preparación y el mecanismo de acción de las vacunas basadas en DCs.

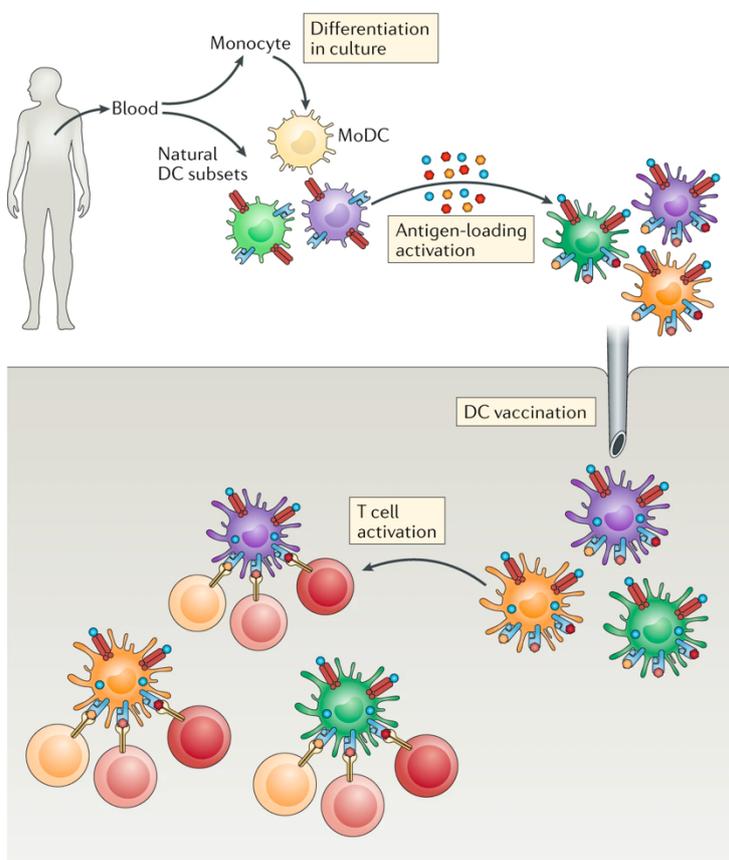


Figura 126. Esquema representativo de la preparación de una vacuna de células dendríticas (DCs) y efectos de su administración. Las DCs se aíslan, de sangre periférica, a partir de precursores o se derivan de monocitos. *In vitro* se produce su diferenciación, activación y carga de antígenos, para ser posteriormente administrados en el paciente en el cual inducirán la activación de linfocitos T específicos. Adaptado de (119).

Las vacunas de células dendríticas llevan usándose desde hace más de 25 años. A pesar de que han demostrado que son seguras, con resultados preclínicos muy prometedores y que son capaces de potenciar la respuesta inmune antitumoral, los beneficios clínicos demostrados han sido muy limitados, con unas tasas de respuesta objetiva inferiores al 15% (297). Sin embargo, gracias a la gran explosión de nuevos agentes de inmunoterapia de los últimos años, se están explorando distintas combinaciones de vacunas de DCs con otros agentes inmunoterápicos para superar estas limitaciones y controlar mejor el crecimiento tumoral (298).

6.1. Elección de la fuente de antígenos tumorales

Para empezar el diseño de una vacuna de DCs, lo primero es decidir el o los antígenos que vamos a utilizar para cargar las DCs, hacia los cuales queremos inducir una respuesta del linfocito T. Encontrar una fuente de antígenos tumorales apropiada es crucial para conseguir una potente respuesta antitumoral.

Ya hemos visto en el apartado 2 que existen varios tipos de antígenos tumorales diferentes. Los **antígenos específicos de tumor (TSA)** se expresan exclusivamente en las células cancerosas, con lo que no están sometidos a mecanismos de tolerancia central, lo cual los convierte en una fuente de antígenos ideales, porque además no hay riesgo de toxicidad en otros tejidos sanos en los cuales estos antígenos no se van a expresar (20). En tumores asociados a virus (cáncer de cérvix, hepatocarcinoma, sarcoma de Kaposi), los antígenos virales oncogénicos pueden usarse en el diseño de vacunas, como es el caso del virus del papiloma, de hepatitis B o de herpesvirus 8. Lamentablemente, este tipo de tumores originados por virus representan sólo una minoría (299,300). Otros TSA serían los neoantígenos tumorales, que aparecen tras mutaciones somáticas. El problema de este tipo de antígenos es que sólo una pequeña parte de ellos son presentadas en moléculas del MHC y la mayoría no son muy inmunogénicas (301). Además, estos neoantígenos son propias de cada individuo por lo que requieren hacer vacunas totalmente personalizadas.

Aunque lo ideal es utilizar antígenos específicos de tumor (TSA), esto no es posible en muchos tumores, ya que aún no se han identificado dichos antígenos. Como alternativa, están los **antígenos asociados a tumor (TAA)**. Este tipo de antígenos también se expresan en células sanas, pero su expresión aumenta considerablemente en las células tumorales. Puesto que estos antígenos no están restringidos a las células tumorales, con el empleo de ellos en vacunas existe el riesgo de generar toxicidad y respuestas autoinmunes en tejidos sanos. Como

alternativa, se pueden utilizar antígenos cuya expresión en tejidos sanos es muy limitada, como los antígenos de línea germinal y trofoblastos (MAGE-A1, BAGE, NY-ESO-1), o los antígenos oncofetales (TPBG) (302,303). A pesar de que la expresión de estos antígenos es más restringida, el riesgo de toxicidad sigue siendo elevado. Otra de las principales limitaciones es que puesto que son antígenos que se expresan en células sanas, están sometidos a mecanismos de tolerancia central y periférica, con lo que no son capaces de inducir respuestas potentes (304).

Viendo las limitaciones de los TAA, y la falta de TSA identificados en muchos tumores, otra opción es emplear mezclas de distintos péptidos completos o **lisados tumorales**. En este caso, el lisado o mezcla de proteínas debe ser procesada por la DC para poder presentarlo al linfocito T (305). Los lisados tumorales son una fuente de antígenos muy utilizada cuando no se disponen de TSA, aunque en este caso requiere que la vacuna sea personalizada y obtener material tumoral suficiente del paciente para poder generarlo (306). Hay que tener en cuenta que en el caso de utilizar péptidos concretos, la presentación de los mismos va a estar por el HLA (307,308), con lo que no servirá para todos los pacientes y además existe el riesgo de inmuno-escape debido a la presión ejercida sobre unos antígenos concretos del tumor y su consiguiente modificación; por el contrario, las vacunas con lisados tumorales pueden aplicarse de manera universal independientemente del HLA y al ofrecer un repertorio antigénico más extenso, el riesgo de inmuno-escape es menor (309). Como alternativa, podrían usarse también líneas de células tumorales alogénicas, aunque estas tampoco están disponibles en muchos casos. Administrar mRNA tumoral electroporando DCs también es una alternativa en la generación de este tipo de vacunas (310,311). Otra opción que se está explorando en los últimos años es la utilización de vectores virales que contienen los antígenos tumorales en cuestión, en los cuales el vector también puede favorecer el proceso de maduración de las DCs (305).

6.2. Preparación y administración de células dendríticas

Una vez elegida la fuente de antígenos tumorales, es necesario escoger la fuente de las células dendríticas. Es posible aislar DCs a partir de sangre periférica. Aunque las células dendríticas como tal (ya sean cDC1, cDC2 o pDC) son las que tienen una mejor capacidad funcional y de presentación antigénica, se encuentran en muy baja proporción en sangre periférica, por lo que es muy difícil utilizar esta fuente celular para producir vacunas y su uso es muy limitado (309). Es por ello que las células que más se utilizan para elaborar vacunas terapéuticas son las DCs derivadas de monocitos CD14+ (moDCs), ya que son las células

dendríticas más abundantes en la sangre. También pueden derivarse DCs a partir de precursores CD34+, pero su número también es escaso (305). En el caso de moDCs, una vez obtenida la fuente de DCs (normalmente a partir de una leucoaféresis), se aíslan las células de interés (monocitos), mediante técnicas de separación o adherencia. Estos monocitos aislados se transforman en DCs inmaduras tras la adición de IL-4, GM-CSF o IFN- α . En la primera generación de vacunas de DCs se administraban estas células inmaduras cargadas con antígenos tumorales, con unos resultados clínicos de menos del 5% de respuestas (312). Posteriormente, en las siguientes generaciones de vacunas se añade un cóctel madurativo de estímulos junto con la fuente de antígenos tumorales de interés, para que las DCs pasen a un estado maduro. Los estímulos más utilizados para el proceso de maduración de las DCs son LPS, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , agonistas de TLR, PGE2, IL-1 β , IL-6, o poly (I:C), entre otros (306). Este proceso de maduración y activación de la célula dendrítica es crucial para el adecuado funcionamiento de la vacuna, ya que de ello dependerá la capacidad de las células administradas para migrar e inducir la respuesta inmune adecuada en el linfocito T (119). En diversos estudios se ha visto que el LPS es capaz de inducir la expresión de quimiocinas importantes para hacer llegar a las DCs a los ganglios o las zonas de inflamación, como CCL5, CCL4 o CCL23 (306). También se ha visto cómo el TNF- α induce la expresión de otros genes de la familia del TNF como CCL17, IL-10R o IL-13R. Todo este proceso de preparación y administración puede verse resumido en la **figura I27**.

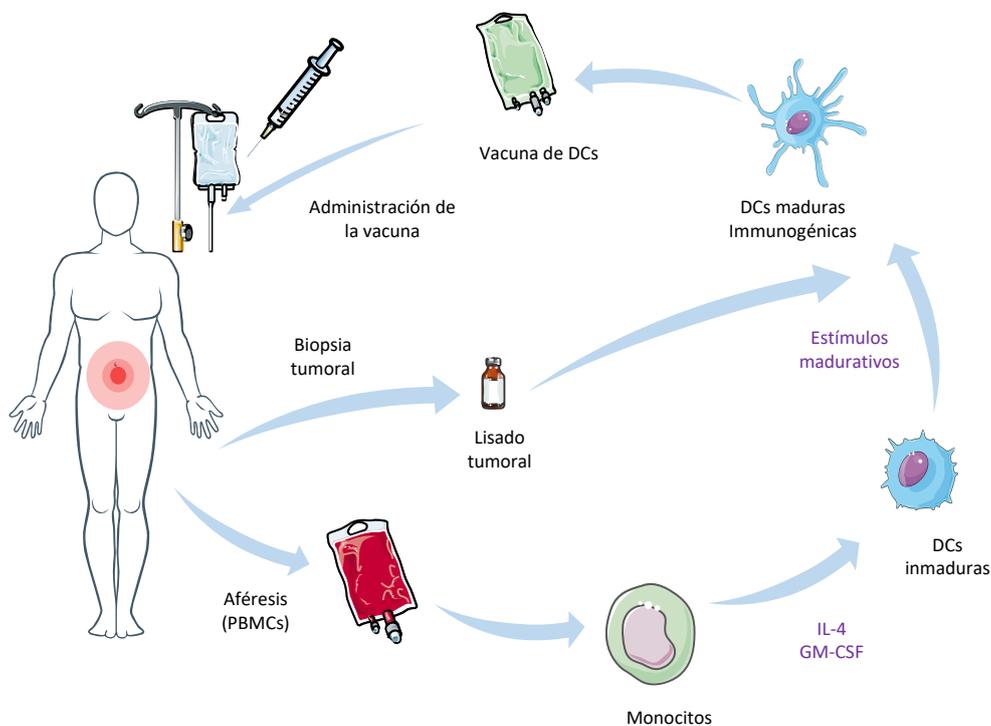


Figura I27. Esquema representativo de la preparación y administración de una vacuna de células dendríticas (DCs) autóloga. Se realiza una leucoaféresis al paciente para aislar monocitos y una biopsia tumoral para obtener un lisado con antígenos tumorales. Los monocitos, aislados mediante adherencia o selección de CD14, se diferencian a DCs con IL-4 y GM-CSF. Posteriormente se añade un cocktail con estímulos madurativos y el lisado tumoral, obteniéndose DCs maduras inmunogénicas que se administran al paciente.

Cuando la vacuna ya está preparada, es importante escoger la ruta adecuada de administración, así como la dosis y la pauta a administrar. No hay un protocolo estándar frente a este respecto y a penas hay ensayos que comparen estos parámetros. No obstante, la migración de las DCs hacia los ganglios linfáticos que drenan el tumor, un factor fundamental para la eficacia de estas vacunas, depende no sólo de la correcta maduración de las DCs si no también del lugar de administración de las mismas. En cuanto a la vía de administración, se han probado numerosas opciones: subcutánea, intratumoral, intravenosa, intradérmica, intraganglionar o por vía linfática (313), siendo las más habituales la intradérmica y la subcutánea, que parecen favorecer mejor la llegada de las DCs a los ganglios linfáticos (314). En este tipo de terapia la vía endovenosa no parecería la más favorable, ya que las células irían a pulmones e hígado y llegarían con más dificultad a los ganglios, sin embargo, algunos ensayos han mostrado que puede ser una vía eficaz (315). En cuanto a la dosis, algunos sugieren que un mayor número de células incrementa la eficacia de la vacuna (313), mientras otros sugieren lo contrario (316). Puesto que no está definida una dosis mínima para resultar efectiva y además hasta ahora no se han reportado problemas de toxicidad con este tipo de vacunas, por lo general la dosis depende de las limitaciones técnicas de la producción y del número de dosis que se hayan pautado. Esta pauta suele ser de 1-10 millones de DCs por inoculación, administradas cada 2-4 semanas durante un período de 3-6 meses y posteriormente dosis de recuerdo más espaciadas (317,318). Todas estas discrepancias en cuanto a la mejor vía de administración y dosis podrían atribuirse a una falta de estandarización en los protocolos que resultan en unos métodos de producción y de fuentes de antígenos tumorales muy dispares. Adicionalmente, las condiciones óptimas de las vacunas pueden variar según el tipo de tumor a tratar.

Más recientemente se han probado dispositivos sintéticos de liberación controlada de DCs. Estos dispositivos, compuestos por matrices 3D biocompatibles, se cargan con las DCs ya estimuladas con los antígenos tumorales y se implantan en el paciente, generando una liberación local de las DCs. Los resultados preliminares han mostrado la eficacia de estos métodos para lograr la estimulación de los linfocitos T (319,320).

6.3. Terapia combinada con células dendríticas

Ya hemos visto que el microambiente tumoral dispone de una serie de factores que pueden inhibir la función de las células dendríticas, tanto su diferenciación, su migración, su capacidad de presentación antigénica como su activación. Todo esto se traduce en una mala función de las DCs y en el consecuente escape tumoral (119). En consecuencia, es necesario buscar otras herramientas que nos permitan mejorar la funcionalidad de las DCs. Las vacunas de DCs han demostrado su capacidad para generar una respuesta inmune-antitumoral, pero insuficiente para erradicar los tumores de manera completa y duradera. Utilizar terapia combinada es una buena alternativa para mejorar la efectividad de las vacunas de DCs y superar los bloqueos que frenan su eficacia clínica.

Son muchos las combinaciones que se están explorando para potenciar la acción de las vacunas de DCs. A continuación, detallaremos aquellas más utilizadas.

Los tratamientos convencionales, como la **quimioterapia**, favorecen la liberación de antígenos tumorales y la muerte celular inmunogénica, que potencia la acción de las DCs. Además, estas terapias también favorecen la actividad antitumoral al favorecer la depleción de MDSCs, Treg y disminuir la carga tumoral. Agentes como la ciclofosfamida, la gemcitabina o la temozolamida, administrados antes o durante el tratamiento con vacunas de DCs, han demostrado mejorar la eficacia al tratamiento, en comparación con la monoterapia de DCs (321–323).

Con la **radioterapia**, otra terapia convencional, también se han observado efectos sinérgicos en combinación con las vacunas de DCs. Al igual que la quimioterapia, favorece la muerte celular inmunogénica, que libera antígenos tumorales y señales de peligro para estimular a las DCs. Además, se ha descrito la capacidad de la radioterapia de generar un efecto abscopal, ejerciendo efectos antitumorales sobre lesiones cancerosas no irradiadas (160,306). La mayor eficacia de esta terapia combinada, con respecto a la vacunación, se ha descrito en diversos modelos (324–326).

Muchos tumores se caracterizan por una baja infiltración de linfocitos T debido a la elevada presencia de agentes y moléculas inmunosupresoras. Utilizando **anticuerpos dirigidos** contra esas moléculas o células inmunosupresoras, también podremos favorecer la actividad de las DCs al facilitar el acceso del linfocito T hacia el tumor. La presencia de IDO favorece el desarrollo de Treg y anticuerpos contra esa enzima incrementan la actividad antitumoral (327,328). Las moléculas proangiogénicas, como VEGF, inhiben la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 o VCAM-1, necesarias para la migración del linfocito T hacia el tumor,

por lo que los inhibidores de VEGF, ya usados como tratamiento estándar en muchos tumores, también tienen la capacidad de potenciar la eficacia de las DCs (20). El empleo de otros anticuerpos bloqueantes, como anti-IL-10 o dasatinib (anti-tirosin kinasas) también han mostrado eficacia en su administración conjunta con DCs en algunos modelos murinos (329,330).

Una de las combinaciones con mayor potencial para incrementar la efectividad de las DCs son los **inhibidores de checkpoints**. Las DCs maduras expresan PD-L1, por lo que los ICIs pueden desbloquear la inhibición de las propias DCs además de la que padecen los linfocitos T estimulados por las DCs. En estudios preclínicos se ha observado este efecto sinérgico al añadir un bloqueante de la vía PD1/PD-L1 a las DCs, que se traducía en un incremento de la secreción de IFN- γ , un descenso en la IL-10 y un bloqueo más efectivo de las células Treg (331,332). Los buenos resultados preclínicos han alentado al desarrollo de ensayos clínicos que exploren esta vía, aunque por el momento se han dado a conocer pocos resultados. Además de los bloqueantes de la vía PD1/PD-L1, también se ha probado la combinación de DCs con bloqueantes de CTLA-4. En 2 ensayos clínicos de pacientes con melanoma en los cuales combinaban una vacuna de DCs con ipilimumab y tremelimumab se observó un incremento en la respuesta anti-tumoral específica de los linfocitos T, aunque no se asoció con una mejoría clínica (333,334). Por el contrario, en otro ensayo combinado con ipilimumab se consiguió una respuesta global del 38% en pacientes con melanoma (335).

En la **tabla 110** se resumen los ensayos clínicos activos que exploran esta combinación. En dicha tabla puede verse que los tumores aplicables son muy variados y que el tipo de vacuna de DCs empleada difiere en todos ellos, lo cual dificulta comparar los diferentes ensayos y pone de manifiesto la falta de estandarización que existe en los diferentes ensayos.

Tabla 110. Ensayos clínicos activos que combinan terapia con vacunas de células dendríticas (DCs) y checkpoints inhibitors.

Clinicaltrial.gov ID	Tipo de tumor	Vacuna de DCs	Checkpoint inhibitor
NCT03406715	Pulmón	OC con p53	ipilimumab + nivolumab
NCT03879512	Glioblastoma	DCs con lisado tumoral	ipilimumab + nivolumab
NCT04912765	Hepatocelular y colorrectal	DCs con neoantígenos individualizados	nivolumab
NCT04571632	Tumores sólidos	DCs mieloides CD1c+/CD141+	avelumab + ipilimumab + pembrolizumab
NCT03743298	Melanoma	DCs con antígenos de células tumorales autólogas	pembrolizumab o nivolumab
NCT04093323	Melanoma	Alpha-type-1 Polarized DCs (aDC1)	Celecoxib + Interferon Alfa-2b + Rintatolimod + anti-PD-1/PD-L1
NCT04203901	Renal	DCs con RNA tumoral autólogo	Nivolumab+ipilimumab

6.4. Vacunas de células dendríticas en el tratamiento del cáncer colorrectal

Como hemos visto, las vacunas de células dendríticas llevan utilizándose desde hace décadas para el tratamiento de diversos tumores. En el caso del cáncer colorrectal, esta estrategia terapéutica también se ha explorado en diversos ensayos. En dichos ensayos, al igual que ya hemos comentado en los apartados anteriores, puede observarse una gran variabilidad en cuanto a la fuente de antígenos utilizada, el cocktail madurativo, la vía de administración o la dosis. Esta falta de estandarización hace difícil estudiar los ensayos en su conjunto para poder compararlos.

Se han identificado numerosos TAA expresados en CCR con el potencial de ser utilizados en vacunas terapéuticas: CEA, WT1, MUC1, GUCY2C, RNF43, TOMM34, 5T4, SART3 o hTERT, entre otros (336), siendo CEA y MUC1 los más frecuentemente utilizados. Las vacunas de DCs cargadas con CEA han demostrado ser capaces de inducir respuestas T específicas con un beneficio clínico asociado (337).

En la **tabla I11** se recogen los principales estudios con DCs en cáncer colorrectal. En líneas generales, la mayoría son estudios que utilizan DCs cargadas con lisados tumorales y han demostrado que estas vacunas son seguras, capaces de generar una respuesta inmune específica contra los tumores colorrectales, pero con unas tasas de respuesta clínicas muy limitadas, de alrededor de un 15% (338,339). Esta dificultad en la mejora de la supervivencia libre de progresión o en la supervivencia global podría solventarse utilizando terapias combinadas y en estadios menos desarrollados de la enfermedad. Además, la gran mayoría son ensayos de fase I/II en los que no se comparan distintas opciones de tratamiento o diversos protocolos de producción de las DCs, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios comparativos que puedan demostrar la eficacia de estas vacunas en el cáncer colorrectal.

Tabla I11. Resumen de ensayos clínicos completados con células dendríticas (DCs) en el tratamiento del cáncer colorrectal.

Fase	Antígeno tumoral	n	Intervenciones	Resultados	Referencia
I	Lisado tumoral completo	24	Vacuna DCs +/- vacuna BCG	Respuesta T específica 67%	Hoover, et al. 1984
I	Lisado tumoral completo	18	DCs autólogas	Respuesta global 22%	Kuwabara, et al. 2007
II	Lisado tumoral completo	20	DCs autólogas	Enfermedad estable 24%	Burgdorf, et al. 2008
I	Lisado tumoral completo	41	DCs autólogas	Respuesta global 43%	Kamigaki, et al. 2013
II	Lisado tumoral completo	38	DCs autólogas (APECEDEN)	Respuesta global 28,9%, supervivencia global 397 días	Bapsy, et al. 2014
II	Lisado tumoral completo	28	DCs autólogas vs tratamiento	Respuesta T específica 87,5% Respuestas clínicas globales 0%	Caballero-Baños, et al. 2016
I/II	Lisado tumoral completo	44	DCs autólogas	Respuesta global 19%	Herbert, et al. 2018
I	Lisado tumoral completo	15	DCs autólogas, pol i-HCLC, IFNa, ciclofosfamida, radioterapia (SABR)	Respuesta global 50%	Rodríguez-Ruiz, et al. 2018 rad

A pesar de estos resultados, que muestran una limitada eficacia de estas vacunas para controlar la enfermedad, siguen explorándose nuevas vías de tratamiento con ensayos que permitan mejorar los resultados clínicos en estos pacientes. En la **tabla I12** podemos ver algunos ejemplos de estos nuevos ensayos, muchas en combinación con otras terapias y la mayoría utilizan vacunas más personalizadas con neoantígenos tumorales.

Tabla I12. Resumen de ensayos clínicos activos con células dendríticas (DCs) en el tratamiento del cáncer colorrectal.

Clinicaltrial.gov ID	Fase	Intervención	n	Vía de administración
NCT01885702	I/II	DCs cargadas con neoantígenos	25	ND
NCT05518032	II	DCs cargadas con lisado tumoral autólogo + pembrolizumab	20	Intratumoral
NCT03730948	I	DCs cargadas con péptidos mutados + ciclofosfamida	12	ND
NCT02919644	II	DCs cargadas con lisado tumoral autólogo + IL-2	19	Intradérmica
NCT04912765	II	DCs cargadas con neoantígenos + nivolumab	60	Intradérmica
NCT04147078	I	DCs cargadas con neoantígenos	80	Subcutánea

6.5. Limitaciones de la terapia con células dendríticas

Hasta la fecha, la única vacuna de DCs que ha sido aprobada por la FDA (en 2010) es Sipuleucel-T, para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado (18). Esta vacuna logró demostrar un beneficio en la supervivencia global de 4,1 meses, en comparación con placebo, aunque actualmente su eficacia es discutida.

A pesar de la gran experiencia que hay con este tipo de terapia, que se lleva usando durante décadas, hemos visto que no se han conseguido alcanzar las respuestas clínicas esperadas, y que dichas respuestas no se correlacionan con las respuestas celulares específicas de los linfocitos T que sí se han demostrado. También hemos visto una falta de estandarización en cuanto a los protocolos de producción y administración de estas vacunas, lo cual hace pensar que es una terapia que aún debemos optimizar.

Las vacunas muchas veces se administran en estadios avanzados de cáncer, cuando la efectividad de la terapia es más difícil ya que el ambiente tumoral está más inmunosuprimido. Se ha observado que las respuestas clínicas son mejores cuando las vacunas se administran en estadios iniciales o como terapia adyuvante (340,341), lo cual apoya la idea de utilizar este tipo de terapias en los primeros estadios de la enfermedad y no esperar a enfermedades avanzadas.

Es necesario seguir investigando y diseñando estudios que nos permitan comparar cuáles son los mejores parámetros que debemos emplear para optimizar estas vacunas y estandarizarlos: subtipo de células dendríticas, cóctel madurativo, vía de administración, dosis o fuente de antígenos tumorales.

También hemos de hacer hincapié en la terapia combinada, que parece mejorar la eficacia de estas vacunas, y seguir estudiando cuál es la combinación óptima.

Está claro que las DCs están equipadas para estimular de manera potente a los linfocitos T antitumorales, pero sólo pueden ejercer esta función si están correctamente activadas, maduras y son capaces de migrar al lugar adecuado. Además, necesitan que otros factores favorezcan su actividad para que el linfocito T destruya la célula cancerosa. Un tratamiento antitumoral eficaz requiere tanto activar la inmunidad antitumoral como inhibir el ambiente inmunosupresor, y ese efecto sinérgico puede lograrse con células dendríticas y una combinación adecuada.

7. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial, siendo el tercer cáncer en cuanto a nuevos casos diagnosticados (1,8 millones al año) y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer (casi 900.000 personas cada año) (342). En España, es el cáncer más frecuentemente diagnosticado y el segundo con mayor mortalidad tras el cáncer de pulmón. Los datos epidemiológicos del cáncer colorrectal se muestran en la **figura 128**.

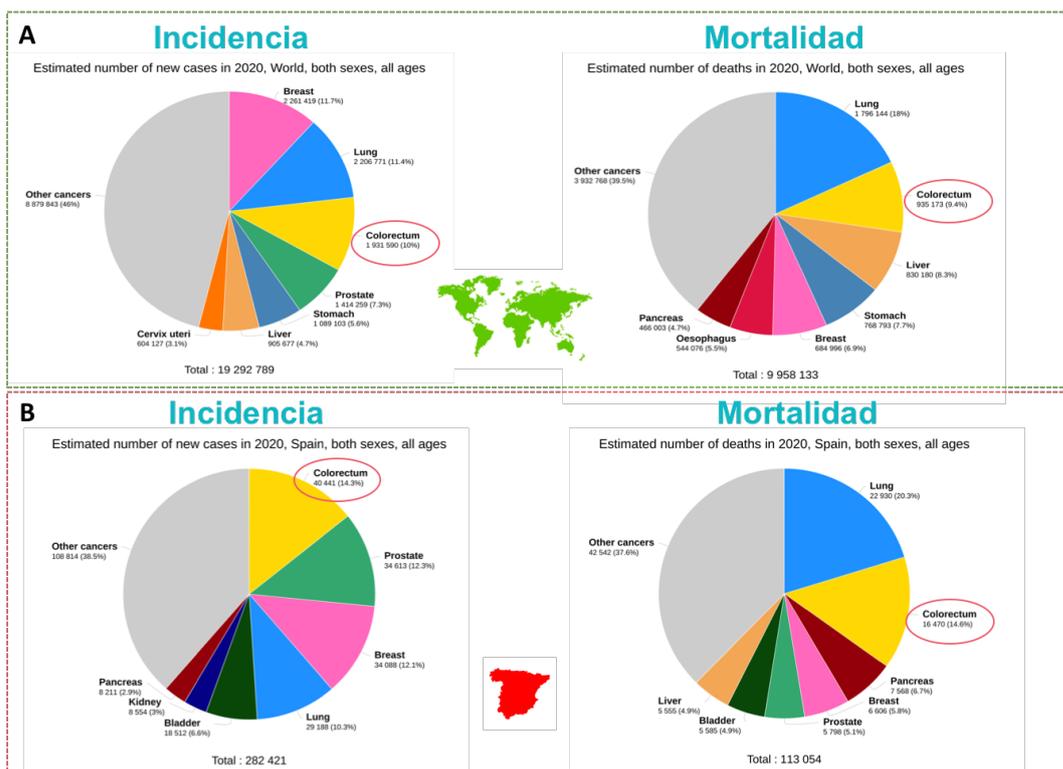


Figura I28. Datos epidemiológicos del cáncer colorrectal. Los datos de incidencia y de mortalidad se muestran a nivel mundial y en España. Datos obtenidos de *Globocan 2020*.

A pesar de los avances en cuanto a detección precoz de los últimos años, en casos de enfermedad avanzada la mortalidad es elevada. La supervivencia libre de progresión a los 12 meses es menor al 40% en los pacientes diagnosticados de CCR metastásico (mCCR), mientras que la supervivencia global a los 5 años en estos pacientes es sólo del 5% (343). El riesgo de aparición de la enfermedad aumenta con la edad, siendo más del 90% de los pacientes diagnosticados con más de 50 años de edad (edad media al diagnóstico de 64 años), aunque la incidencia en población joven de menos de 50 años ha ido en aumento los últimos años (342).

Hay diversos factores que pueden aumentar el riesgo de padecer este tipo de cáncer, tanto hereditarios como ambientales (344). Entre los principales factores hereditarios destacan ciertas enfermedades como la diabetes tipo II, la enfermedad inflamatoria intestinal o tener historia familiar con CCR (aproximadamente un 10-20% de pacientes con CCR tienen historial familiar de esta enfermedad) (345). Por otro lado, ciertos factores externos que dependen del estilo de vida, como la obesidad, el tabaco, el alcohol, la baja actividad física, la dieta alta en carne roja y baja en fibra o fruta, también incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad (346–349) (figura I29).

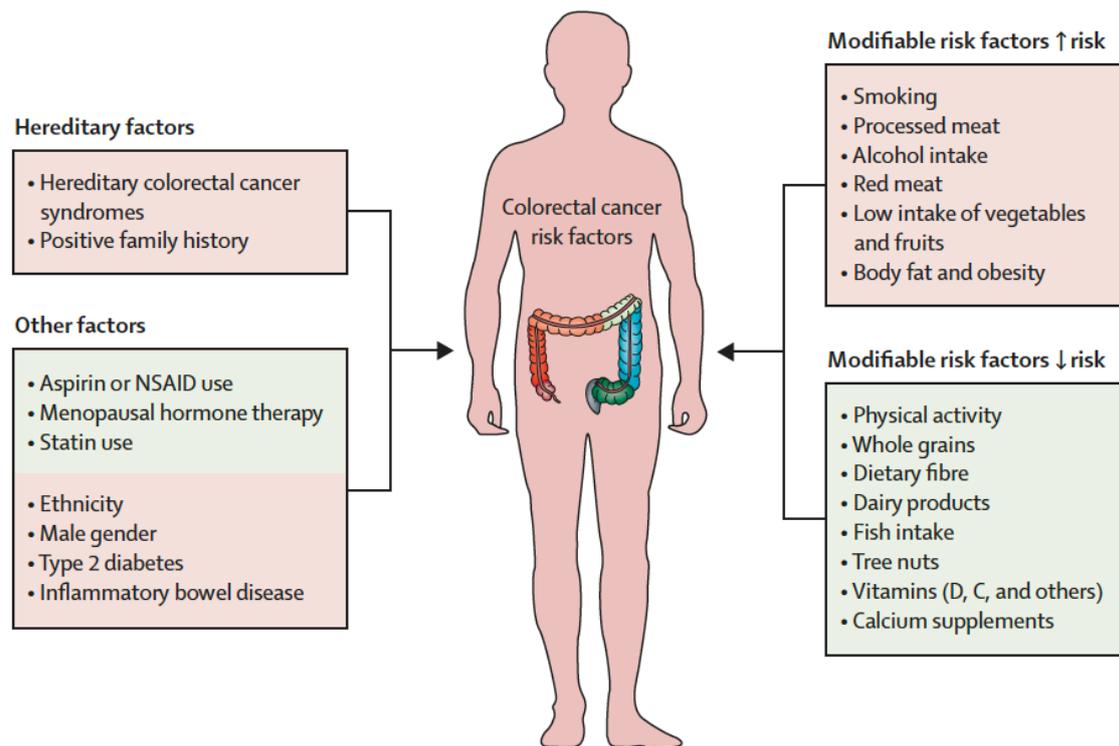


Figura I29. Factores hereditarios y modificables en el desarrollo del cáncer colorrectal. NSAIDs, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Adaptado de (345).

Tradicionalmente, se distinguen 2 grupos principales de CCR (350) (**figura I30**):

- **dMMR** (*deficient mismatch-repair mechanisms*), **MSI** (*microsatellite-unstable*) o **MSI-high**. Este grupo se caracteriza por tener una alta carga de mutaciones, pero solamente representa el 15% de todos los CCR y el 4% de los CCR más avanzados.
- **pMMR** (*proficient mismatch-repair mechanisms*), **MSS** (*microsatellite-stable*) o **MSI-low**. Este grupo se caracteriza por presentar una baja-moderada carga de mutaciones, y representan la mayoría de los CCR y la que peor responde a la terapia.

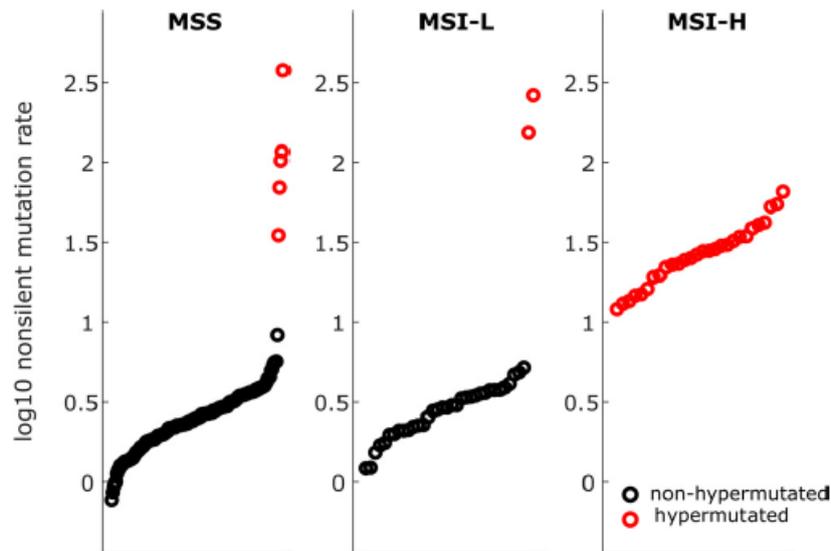


Figura I30. Carga mutacional, ratio de hipermutaciones y su relación con el subtipo de cáncer colorrectal. Los tumores de tipo MSI-H tienen una carga mutacional y una ratio de hipermutaciones más elevados que los tumores de tipo MSS y MSI-L.

En 2015, se publicó una **clasificación** el cáncer colorrectal en 4 subtipos moleculares en función de su expresión genética (*consensus molecular subtypes, CMS*) (351). Estos 4 subgrupos se caracterizan por los siguientes aspectos: CMS1 (MSI inmune), hipermutado, MSI y gran activación inmune; CMS2 (canónico), epitelial, activación de las vías de WNT y MYC; CMS3 (metabólico), epitelial y con disregulación metabólica; CMS4 (mesenquimal), activación de TGF- β , invasión estromal y angiogénesis. Esto se traduce en que los tumores de subtipo CMS4 son los menos inmunogénicos y los de subtipo CMS1 los que más, lo que concuerda con los datos de peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión observados en el subtipo CMS4, comparado con los otros subtipos tumorales (**figura I31**). Esta clasificación se utiliza en algunos ensayos clínicos para predecir la respuesta de estos tumores a la inmunoterapia.

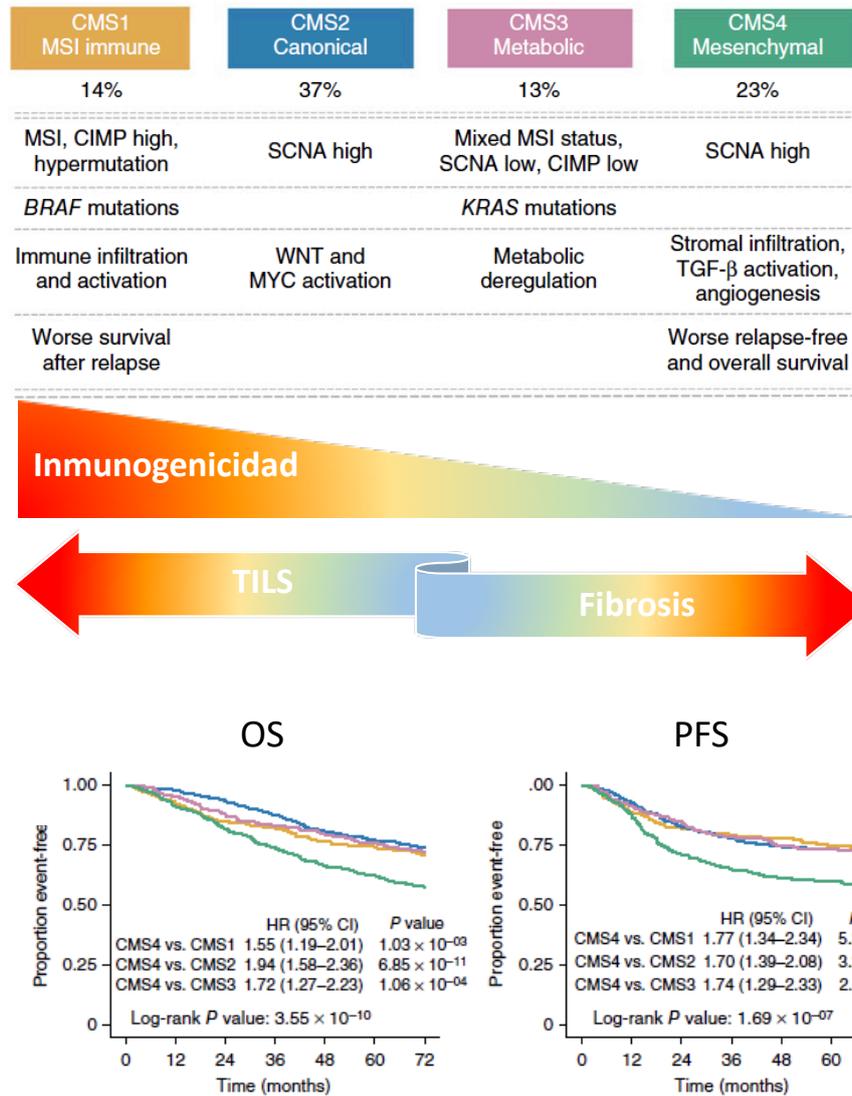


Figura I31. Clasificación del cáncer colorrectal en subtipos moleculares. Valor pronóstico de esta clasificación con el análisis de curvas de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de progresión (PFS) de Kaplan-Meier (n= 2129) en los 4 grupos: CMS1 (amarillo), CMS2 (azul), CMS3 (rosa) y CMS4 (verde). CIMP, *CpG island methylator phenotype*; MSI, *microsatellite instability*; SCNA, *somatic copy number alterations*. Adaptado de (351).

La mayoría de los tumores colorrectales se originan cuando las células epiteliales de las criptas acumulan una serie de transformaciones (por mutaciones espontáneas, agentes mutagénicos externos o cambios epigenéticos) que les confieren un fenotipo hiperproliferativo, normalmente por mutaciones en APC, KRAS o BRAF, entre otros (fase conocida como iniciación). Estas células forman un adenoma benigno, que a lo largo del tiempo (hasta 20 años) pueden seguir creciendo y progresar hasta transformarse en un carcinoma (fase de promoción). Con la aparición de nuevas mutaciones y cambios en el

microambiente tumoral, pueden originar metástasis, principalmente a hígado y pulmones (fase de progresión) (352,353) (figura I32).

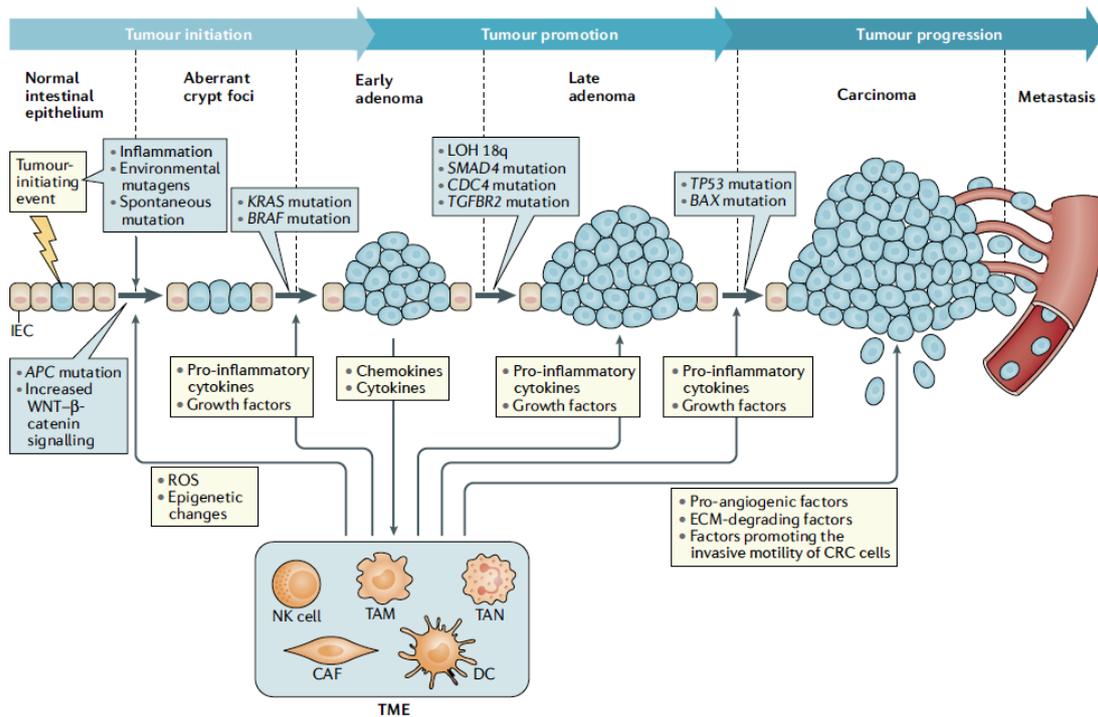


Figura I32. Patogénesis del cáncer colorrectal. Mecanismos de iniciación y promoción tumoral. CAF, cancer- associated fibroblast; DC, dendritic cell; ECM, extracellular matrix; LOH, loss of heterozygosity; NK, natural killer; TAM, tumour- associated macrophage; TAN, tumour- associated neutrophil. Adaptado de (353).

Las **vías moleculares** por las cuales se originan estas mutaciones se dividen en 3 grupos: convencional, serrada y MSI. La mayoría de los casos de CCR (70-80%) se originan por la vía convencional, también llamada CIN (inestabilidad cromosómica, *chromosomal instability*), que se asocia a niveles elevados de CIN, MSS y bajos/nulos niveles de CIMP (*CpG island methylation pathway*). La segunda vía más común (20-30% de los casos de CCR) es la serrada, que puede a su vez subdividirse en tumores MSS CIMP^{low} (generalmente con mutaciones en KRAS), tumores MSS CIMP^{high} con mutaciones de BRAF y tumores MSI CIMP^{high} con mutaciones en BRAF. La tercera vía, y la menos frecuente, es la vía MSI, originada por la alteración en los genes de reparación del DNA, que se asocia a CIMP negativo y MSI. Las distintas mutaciones implicadas en cada una de las vías y su relación con la clasificación CMS están resumidas en la **figura I33**.

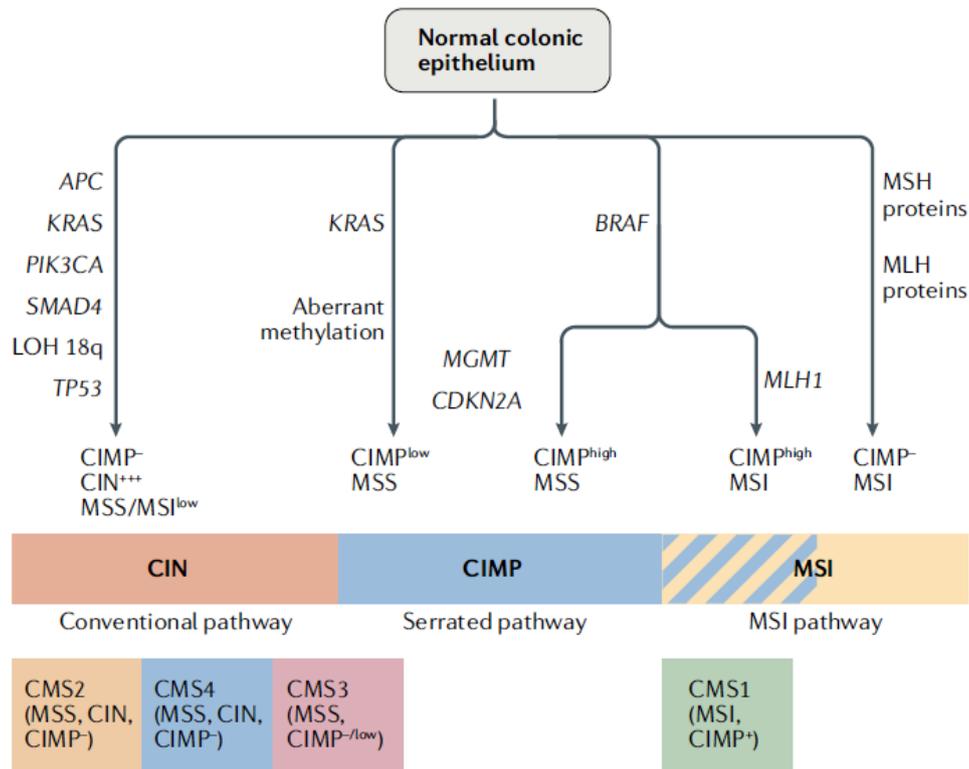


Figura I33. Vías moleculares de la patogénesis del cáncer colorrectal. CIMP, CpG island methylation pathway; CIN, conventional chromosomal instability; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability. Adaptado de (353).

En cuanto al **tratamiento** del CCR (**figura I34**), en el caso de enfermedad localizada la primera opción es la cirugía, con o sin terapia adyuvante con quimio o radioterapia. Sin embargo, un gran número de pacientes se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad, con lo que la cirugía como único tratamiento curativo no es suficiente. En primera línea de tratamiento encontramos distintos fármacos quimioterápicos, la mayoría usados en combinación: FOLFOX (fluoropirimidina, 5-FU + oxaliplatino), FOXFIRI (5-FU + irinotecan), CAPOX (capecitabina + oxaliplatino) y CAPIRI (capecitabina + oxaliplatino) son los regímenes más utilizados (352). Sin embargo, la eficacia limitada de esta terapia tradicional, junto con su elevada toxicidad, hacen que se estén desarrollando nuevas alternativas. La aparición de las terapias dirigidas ha supuesto un gran avance en el tratamiento del CCR. El gran éxito de cetuximab (anti-EGFR) y bevacizumab (anti-VEGF) supuso que, tras su aprobación en 2004, aumentasen exponencialmente los estudios hacia nuevas terapias dirigidas (354). Aunque los fármacos más utilizados van dirigidos contra EGFR y VEGF, otras terapias incluyen bloqueantes de HGF (hepatocyte growth factor), c-MET (mesenchymal-epithelial transition factor), IGF/IGF-1R (insulin-like growth factor/insulin-like growth factor 1 receptor), TGF (transforming growth factor), Wnt/ β -catenina, o Notch, entre otros (352). Otros fármacos

como panitumumab, ziv-aflibercept, regorafenit o ramucirumab han sido aprobados desde entonces. Los inhibidores de MEK o BRAF también están siendo utilizado, generalmente en combinación en pacientes refractarios a otros tratamientos. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los ICIs también se utilizan en este tipo de cáncer, aunque sólo han mostrado eficacia en los tumores de tipo dMMR/MSI, en los cuales están aprobados pembrolizumab, nivolumab e ipilimumab. La terapia celular adoptiva o el empleo de vacunas son terapias que también se han explorado en estos tumores, con resultados variables.

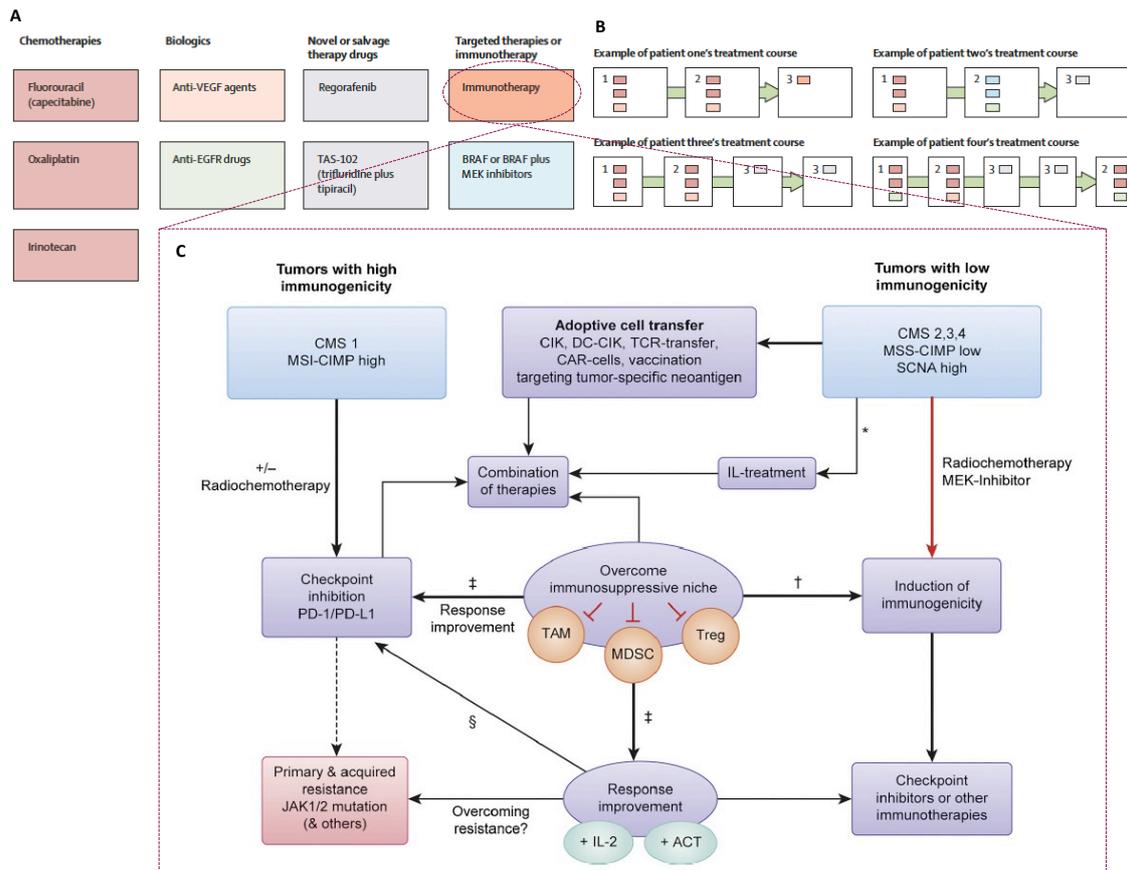


Figura I34. Esquema de tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR). Existen distintos fármacos disponibles para el tratamiento del mCCR (A), usados frecuentemente en combinación. Por lo general, los pacientes pasan por distintos regímenes de tratamiento de manera secuencial (B). Esquema de las opciones de inmunoterapia (C). Adaptado de (345,355).

A pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado en los últimos años por mejorar la detección precoz del CCR, así como por mejor el tratamiento ampliar las vías de estudio con distintas terapias dirigidas hacia dianas y mecanismos diversos, la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando, la supervivencia global a los 5 años continúa siendo inferior al 10%, y la mayoría de los pacientes presentará una progresión de la enfermedad.

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las vacunas de células dendríticas (DCs, *dendritic cells*), a pesar de haber demostrado su seguridad y capacidad para estimular linfocitos T específicos de tumor, han evidenciado una eficacia clínica reducida. Los fármacos inhibidores de punto de control (ICI, *immune checkpoint inhibitors*) han revolucionado el tratamiento del cáncer al lograr respuestas clínicas en estadios muy avanzados, aunque todavía existen grupos de tumores en los cuales esta terapia resulta ineficaz. Debido a estas limitaciones, se hace necesario encontrar biomarcadores para predecir la respuesta a estos tratamientos, así como encontrar alternativas terapéuticas que permitan evitar los mecanismos de evasión tumoral.

La **hipótesis** de trabajo que se propone en esta tesis es la siguiente: la combinación de vacunas terapéuticas de células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) con inhibidores de punto de control (ICI, *immune checkpoint inhibitors*) potenciará la respuesta inmunitaria antitumoral de los linfocitos T (LT) de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRM), cuya activación sinérgica tendrá impacto en sus respuestas clínicas, y postulamos que será posible identificar biomarcadores de respuesta a dicho tratamiento que podrá aplicarse para reconocer al grupo de pacientes respondedores a esta terapia combinada.

Objetivos

El **objetivo principal** de esta tesis es la identificación de biomarcadores que puedan ser útiles a la hora de predecir la eficacia de la inmunoterapia combinada de DCs con ICI en pacientes con CCRm mediante la monitorización de la respuesta inmunitaria, de cara a la posterior selección del grupo de pacientes óptimo que puedan beneficiarse de este tipo de terapia en la práctica clínica.

Los objetivos específicos planteados en base a esta aproximación son:

1. Evaluación *in vitro* del efecto sinérgico de la combinación de células dendríticas con inhibidores de la vía PD-1/PD-L1.
2. Caracterización del microambiente tumoral en pacientes con cáncer colorrectal:
 - 2.1. Obtención de linfocitos infiltrantes de tumor TILs, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) a partir de biopsias del tumorales.
 - 2.2. Caracterización del fenotipo y del perfil de producción de citocinas de los TILs.
 - 2.3. Obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica.
 - 2.4. Generación y caracterización de líneas tumorales y lisados a partir de las mismas biopsias tumorales.
3. Monitorización y evaluación de la respuesta inmune antitumoral en los pacientes tratados con la terapia combinada incluidos en el ensayo clínico, comparando la situación pre- y post-tratamiento:
 - 3.1. Obtención y caracterización de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) a partir de biopsias del tumor.
 - 3.2. Generación de líneas tumorales y lisados a partir de las mismas biopsias del tumor.
 - 3.3. Obtención y caracterización de células dendríticas a partir de sangre periférica.
 - 3.4. Monitorización de la respuesta inmunitaria de linfocitos T en células de sangre periférica (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) comparando pre- y post-tratamiento (mediante su fenotipo y la producción de citocinas)
 - 3.5. Determinación de la potencia de la combinación de DCs y anticuerpos anti PD-L1 para activar *in vitro* a los TILs y linfocitos T procedentes de PBMCs.
 - 3.6. Análisis y evaluación de las diferencias en las firmas de expresión génica de los pacientes con CCR metastásico tratado y no tratado y de cómo éstas pueden influir en la eficacia del tratamiento.
 - 3.7. Evaluación del papel del HLA.

III. Materiales y Métodos

1. Estudios *in vitro* (pre-clínica):

1.1. Cultivos celulares:

Los ensayos con PBMCs, DCs, TILs y líneas tumorales se realizaron mediante cultivos celulares que se mantuvieron en incubadores estándar (Thermo Scientific) a una temperatura constante de 37°C y una presión parcial de CO₂ de 5%, con un 95% de humedad, en placas o frascos de cultivo con tapón ventilado (Nunc, Dinamarca) de diferentes capacidades en función de las necesidades del experimento.

1.1.1. Obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica

Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica (figura M1)

Partiendo de un volumen de sangre de \approx 40 ml, el procedimiento realizado para obtener PBMCs por gradiente de densidad fue el siguiente:

- a. La sangre periférica se mezcló con una cantidad equivalente de PBS estéril.
- b. Se distribuyeron 15 ml de Ficoll-paque (Sigma) en 2 tubos de 50 ml.
- c. Se depositó suavemente la mezcla de sangre diluida con PBS encima del ficoll.
- d. Se centrifugaron los tubos a 2000 rpm durante 20 minutos, a 20°C, sin aceleración ni frenada.
- e. Tras la centrifugación, se recogió el anillo blanquecino de células que quedaba en la interfase entre el ficoll y el plasma, con una pipeta Pasteur estéril, y se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml (figura M1).
- f. Se añadió PBS estéril hasta los 50 ml y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos, a 20°C.
- g. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular resultante se resuspendió con PBS estéril y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, a 20°C, para eliminar las plaquetas.
- h. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular resultante se resuspendió con PBS estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, a 20°C.
- i. Una vez realizados los 3 lavados con PBS, se realizó a un recuento celular con azul de tripán para determinar el número de células obtenidas y su viabilidad. En el caso de observarse muchas plaquetas, se realizó un nuevo lavado a 1000 rpm durante 10 minutos, a 20°C.

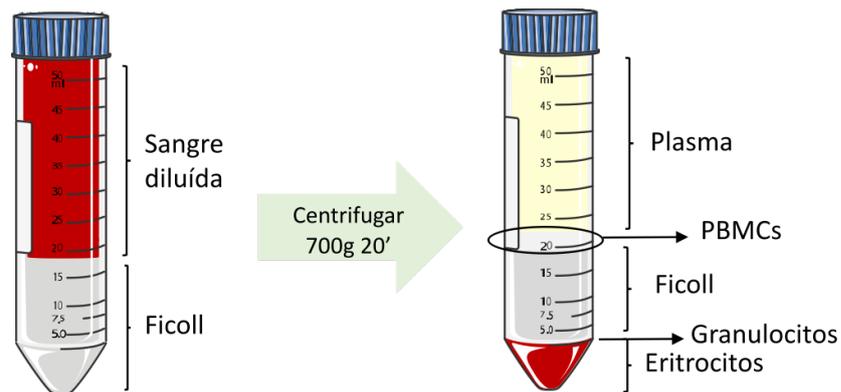


Figura M1. Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica

Día 1: adherencia de los monocitos y diferenciación a células dendríticas inmaduras

- a. Una vez obtenidos los PBMCs, éstos fueron resuspendidos en medio de cultivo X-VIVO 15 (Lonza) a una concentración de $\approx 2 - 5 \times 10^6$ células/ml y se distribuyeron 12 ml de esta suspensión celular en frascos de cultivo T-75.
- b. Se dejaron los frascos de cultivo durante 2 horas en el incubador celular a 37°C, para permitir la adherencia de los monocitos al plástico.
- c. Pasadas las 2 horas, se recogieron cuidadosamente las células no adheridas al plástico que se encontraban en el sobrenadante (células que no son monocitos, principalmente PBLs, *Peripheral blood lymphocytes*), mediante pipeteo suave. Estas células fueron criopreservadas para ser utilizadas en otros estudios.
- d. Se lavaron las células adheridas con PBS a temperatura ambiente (TA) 2 – 3 veces (controlando, mediante visualización al microscopio, que los monocitos no se desenganchaban y que no quedaban PBLs).
- e. Una vez recogido el sobrenadante con las PBLs, se añadieron 12 ml medio de cultivo X-VIVO 15 + 2% suero humano AB inactivado (HS, *human serum*) a cada frasco T-75 y se suplementaron con los factores de crecimiento y diferenciación interleukina -4 (IL-4, Miltenyi Biotec®) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, Miltenyi Biotec®) a una concentración final de 1000 UI/ml.
- f. Los frascos de cultivo se dejaron en el incubador celular a 37°C durante 2 días.

Día 3: Recuento celular

- a. Se recogió cuidadosamente el sobrenadante de los frascos de cultivo.
- b. Se añadió PBS frío (4°C) sobre las células y se dejaron los frascos de cultivo a 4°C durante 30 minutos.
- c. Se lavaron los frascos de cultivo con PBS frío, pipeteando y repitiendo el proceso hasta haber desenganchado todas las células adheridas.

- d. Las células desenganchadas se lavaron 2 veces con PBS centrifugando a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.
- e. Se realizó un recuento celular con azul de tripán y se resuspendieron las células en medio de cultivo X-VIVO 15 + 2% HS a una concentración de $0,5 - 1 \times 10^6$ células/ml.
- f. Se distribuyeron 12 ml de esta suspensión celular en frascos de cultivo T-75 y se suplementaron de nuevo con IL-4 y GM-CSF a una concentración final de 1000 UI/ml.
- g. Los frascos de cultivo se dejaron en el incubador celular a 37°C durante 4 días.

Día 7: Maduración de las células dendríticas

- a. Se añadió directamente a los frascos de cultivo un cóctel de citocinas denominado cóctel madurativo (CM) compuesto por interleukina 1 β (IL-1 β , 10 ng/ml, Miltenyi Biotec®), factor de necrosis tumoral tipo α (TNF α , 10 ng/ml, Miltenyi Biotec®), interleukina 6 (IL-6, 10 ng/ml, Miltenyi Biotec®), prostaglandina E2 (PGE2, 10 μ g/ml, Pfizer®).
- b. También se añadió Poly I:C (Hiltonol, Oncovir®) a una concentración final de 20 μ g/ml para potenciar la maduración de las células dendríticas.
- c. En los casos en los que se deseaba sensibilizar las células dendríticas contra antígenos tumorales, se añadieron 500 μ L del lisado tumoral.

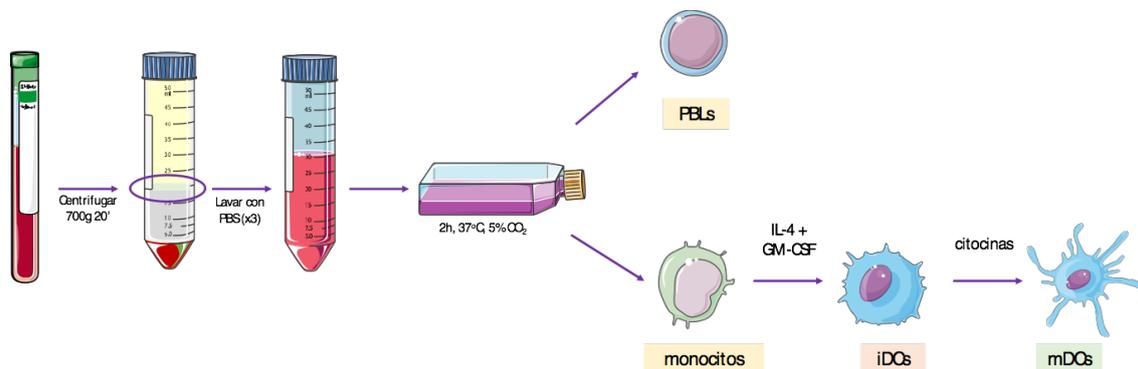


Figura M2. Generación de células dendríticas a partir de sangre periférica. PBLs, *Peripheral blood lymphocytes*; IL-4, interleukina 4; GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*; iDCs, células dendríticas inmaturas; mDCs, células dendríticas maduras.

Día 8: Obtención del producto final

- a. Se realizó un control visual mediante la observación al microscopio del cultivo para comprobar que las células se encontraban en buen estado y descartar la presencia de elementos extraños.
- b. Se recogió cuidadosamente el sobrenadante de los frascos de cultivo y se procedió como en el apartado *Día 3: Recuento celular* (puntos b a d).
- c. Se realizó un recuento celular con azul de tripán y se resuspendieron las células en medio de cultivo X-VIVO 15 + 2% HS a la concentración deseada en función del

experimento a realizar, o bien se criopreservaron (como en el apartado 1.1.2. *Criopreservación de células*). El resumen de este proceso puede verse en la **figura M2**.

1.1.2. Criopreservación de células

La concentración final deseada fue de $\approx 5 - 20 \times 10^6$ células/ml (aunque en ocasiones esta concentración fue menor, en función del uso previsto y la disponibilidad de células). Las células fueron ajustadas a una concentración inicial de 10 a 40×10^6 células/ml en un medio rico en proteínas (albúmina humana GRIFOLS® o el propio medio de cultivo celular, suplementado con HS o FBS) y se añadieron 0.5 ml de esta suspensión celular a cada criotubo de 2 ml (Nunc™), situado sobre un baño de hielo. A continuación, se añadió el mismo volumen de medio de congelación (DMSO (Cryoserv®) al 20% en albúmina), previamente enfriado a 4°C, a los criotubos (dejándolo caer gota a gota y agitando frecuentemente, siempre en frío, para minimizar la toxicidad del DMSO y aumentar la viabilidad de las células). Los criotubos fueron transferidos inmediatamente a -80°C y almacenados en un Mr Frosty™ (Thermo Scientific™) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células fueron trasladadas a un contenedor de nitrógeno líquido hasta el día de su utilización.

1.1.3. Descongelación de células

Se utilizó un medio de descongelación rico en proteínas (PBS, X-VIVO o DMEM suplementado con HS o FBS, *fetal bovine serum*) que se calentó previamente a 37°C. Las células se retiraron del nitrógeno líquido y fueron transportadas en nieve carbónica hasta el baño de 37°C, donde se sumergieron los criotubos y se mantuvieron en agitación constante para favorecer la descongelación. El contenido del criotubo se vertió en un tubo de 15 ml con 10 ml de medio de descongelación a 37°C, suplementado con Benzonase® (ACROBiosystems), se mezcló y se procedió al lavado de las células rápidamente (para eliminar el DMSO), centrifugando a 1500 rpm durante 10 min. Se efectuaron un total de 3 lavados y se procedió a un conteo celular con azul de tripán, ajustando la concentración deseada en función del experimento a realizar.

1.1.4. Mantenimiento de células en cultivo

1.1.4.1. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)

Para poder realizar los estudios de caracterización del microambiente tumoral, así como los ensayos de proliferación celular en respuesta al tratamiento, los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs, *tumor infiltrating lymphocytes*) se mantuvieron en cultivo hasta obtener un número suficiente de células. Se utilizó un medio de cultivo selectivo que favorece la

proliferación de linfocitos T: X-VIVO 15 (Lonza) suplementado con un 2% de suero humano AB inactivado (HS, *human serum*, Sigma Aldrich®), 6000 UI/ml de IL-2 (Proleukin®, Novartis) e inicialmente 2 μ l/100 μ l de suspensión celular de Dynabeads™ CD3/CD28 (Gibco™). Los linfocitos se mantuvieron en cultivo a una concentración de 0.5 - 1 x10⁶ células/ml, cambiando el medio (X-VIVO-2% HS con 2000 UI/ml de IL-2) cada 3 - 4 días, en función de las necesidades, hasta que las células fueron utilizadas o criopreservadas.

1.1.4.2. Líneas tumorales

Para poder realizar los estudios de caracterización del microambiente tumoral, así como los ensayos de proliferación celular en respuesta al tratamiento, las líneas tumorales se mantuvieron en cultivo hasta obtener un número suficiente de células. Se utilizó un medio de cultivo selectivo que favorece la proliferación de células tumorales de cáncer colorrectal: DMEM F12 (Gibco™) suplementado con un 20% de suero fetal bovino australiano (FBS, Gibco™), 50 ng/mL de epitelial growth factor (EGF, Peprotech), 0.36 μ g/mL de hidrocortisona (BD Biosciences) y 10 μ l/mL de Insulin-Transferrin-Selenium (ITS, Gibco™). Al tratarse de células adherentes, para desenganchar las células de la placa o frasco de cultivo se utilizó tripsina-EDTA 0.25% (Gibco™). Las células se mantuvieron en cultivo a una confluencia de \approx 50 - 75%, cambiando el medio cada 3 - 4 días, en función de las necesidades, hasta que las células fueron utilizadas o criopreservadas.

1.1.4.3. Ensayos de proliferación celular con timidina tritiada

Para estudiar la capacidad de las DCs (en presencia o ausencia de diversos antígenos tumorales) de generar una respuesta inmune específica frente a los antígenos tumorales, favoreciendo la estimulación y proliferación de los LT, se llevaron a cabo ensayos de proliferación con cultivos mixtos de células. Los LT proliferantes incorporan timidina tritiada (T-H³).

Las DCs y los LT (TILs o PBMCs) fueron descongelados según lo descrito en el apartado 1.3 de cultivos celulares (*descongelación de células*). Se añadieron 5x10³ DCs y 1x10⁵ LT (ratio DCs:LT 1:20) a cada pocillo de una placa P-96 con fondo en U (Corning®) en 200 μ l de medio X-VIVO 15 - 2% HS y se incubaron durante 6 días a 37°C 5% CO₂ en el incubador celular. Transcurrido ese tiempo, se recogió el sobrenadante de los pocillos (que se guardó a -20°C para analizar niveles de citocinas), se añadió 1 μ Ci/pocillo de T-H³ y se dejaron en el incubador otras 16-18 horas, tras lo cual se recogió todo el contenido de los pocillos (PHD™ cell

harvester, Cambridge Tec) y se transfirió a un filtro de nitrocelulosa, se añadió líquido de centelleo y posteriormente se cuantificó el centelleo mediante un lector de radioactividad β .

Los resultados, expresados en cpm (cuentas por minuto), son directamente proporcionales a la capacidad de proliferación de los LT frente a los estímulos presentados por las DCs.

1.2. Muestras de pacientes

Se obtuvieron muestras de pacientes recién diagnosticados de cáncer colorrectal metastásico (CCRm), en el momento de su inclusión en el estudio (previamente a la administración de ningún tratamiento) y posteriormente en aquellos pacientes que hubieran sufrido una recaída tras el tratamiento recibido. Las muestras fueron biopsias de tumor colorrectal, obtenidas mediante endoscopia; y sangre periférica, obtenida mediante venopunción.

1.2.1. Biopsias tumorales

Para el estudio del microambiente tumoral, la obtención de TILs, líneas tumorales, lisado tumoral y extracción de RNA, se obtuvieron muestras de CCRm obtenidas mediante endoscopia (4 – 6 biopsias), que fueron procesadas según se resume en la **figura M3**. La biopsia fue transportada, desde el lugar de la extracción hasta el laboratorio, en un falcon de 15 ml con 5 ml de medio RPMI 1640 y se transfirió a un tubo de 50 ml donde se realizaron 2 lavados con 25 ml de medio RPMI 1640 y 2% de penicilina-estreptomicina-anfotericina (PSA), en agitación, para minimizar la contaminación del entorno colorrectal. Posteriormente, un fragmento de la biopsia se transfirió a un criotubo y se guardó en forma de pellet seco a -80°C , para la posterior extracción de RNA; otro fragmento se transfirió a un criotubo con 500 μl de PBS, para la posterior generación de un lisado tumoral; y el resto de los fragmentos fueron sometidos a un proceso de disgregación enzimática.

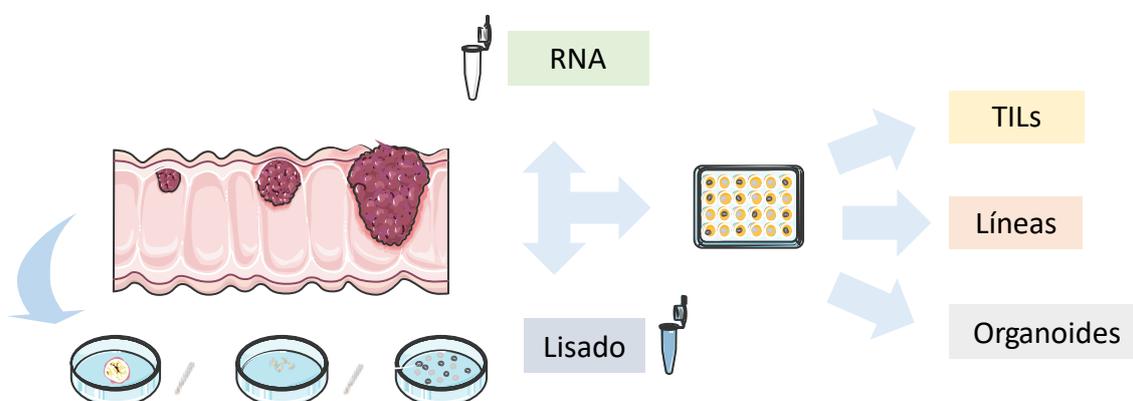


Figura M3. Procesamiento de las biopsias tumorales. Las biopsias obtenidas fueron fragmentadas. Dichos fragmentos fueron repartidos para generar lisado tumoral, extracción de RNA y células (TILs, líneas tumorales y organoides).

1.2.1.1. Procesamiento de la biopsia (y obtención de la suspensión celular)

Para obtener una suspensión celular a partir de una biopsia tumoral, ésta fue sometida a una disgregación mecánica y enzimática, como se ilustra en la **figura M4**.

Tras la fragmentación mecánica de la biopsia con un bisturí y pinzas estériles, los fragmentos resultantes ($\approx 1 \text{ mm}^3$) se transfirieron a un tubo especialmente diseñado para la obtención de suspensiones celulares (gentleMACS C Tube, Miltenyi Biotec[®]) con 4.7 ml de medio RPMI 1640 (Gibco[™]), se añadieron las enzimas correspondientes al kit comercial *Tumor Dissociation Kit, human* (Miltenyi Biotec[®]): 200 μl de enzima H, 100 μl de enzima R y 25 μl de enzima A y se siguió el procedimiento estandarizado según las instrucciones del fabricante. Éste consistió en 3 procesos de disgregación mecánica, utilizando el disgregador automatizado gentleMACS[™] Dissociator (Miltenyi Biotec[®]), intercalado por 2 incubaciones de 30 minutos en una estufa seca a 37°C, en rotación. A continuación, el contenido del tubo se filtró con un filtro de 70 μm y se lavó con PBS centrifugando 1500 rpm durante 5 min, tras lo cual se obtuvo una suspensión celular homogénea, que se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640.

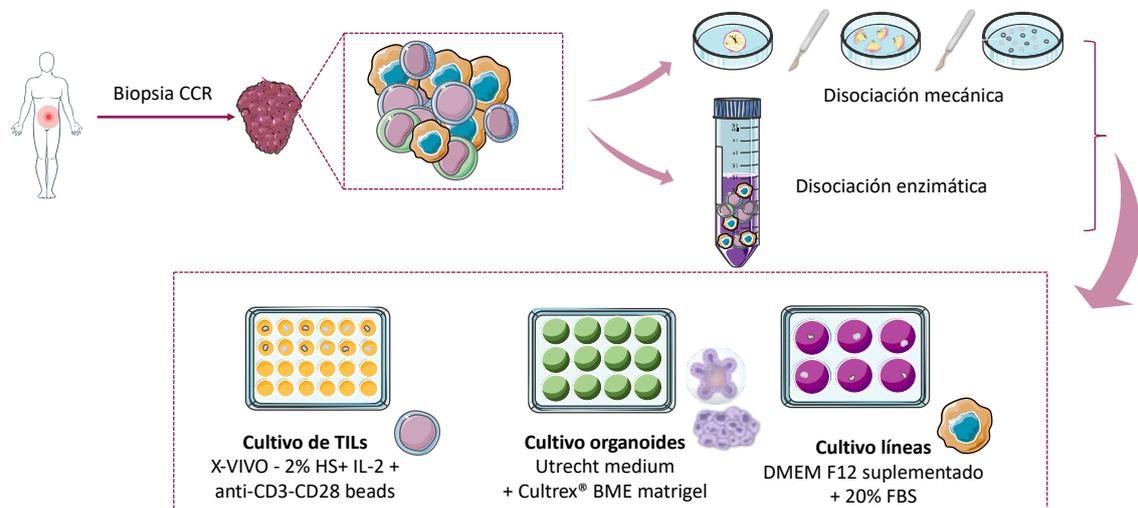


Figura M4. Obtención de una suspensión celular a partir de una biopsia tumoral.

1.2.1.2. Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)

Una vez obtenida la suspensión celular a partir de la biopsia tumoral, una parte fue destinada a la expansión de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Para ello, éstos se transfirieron a una placa de cultivo adecuada en función de la concentración celular, y se mantuvieron en cultivo con medio X-VIVO 15 – 2% HS e IL-2 según lo descrito en el apartado

1.4.1. *de cultivos celulares (Linfocitos infiltrantes de tumor, TILs)*. Cuando se obtuvo un número suficiente, los TILs fueron criopreservados según lo descrito en el apartado 1.2 *de cultivos celulares (criopreservación de células)*.

Para llevar a cabo los estudios de caracterización de TILs, éstos fueron analizados mediante citometría de flujo.

Marcaje y detección de antígenos celulares mediante citometría de flujo

Las tinciones se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo en “U” (Corning®) o en tubos. La lectura se realizó en los citómetros de flujo FACS CANTO II (BD®) y Attune™ NxT (ThermoFisher) y los datos fueron analizados con los softwares FACS Diva (BD®), Attune™ NxT (ThermoFisher) y FlowJo (Tree Star Inc.). Todos los anticuerpos monoclonales utilizados se describen en la **tabla M1**.

Tabla M1. Listado de anticuerpos monoclonales utilizados.

Marcador	Fluorocromo	Descripción	Laboratorio
CTLA-4 (CD152)	PE	Mouse Anti-Human CD152, Clone BNI3	BD Pharmingen™
PD-1 (CD279)	APC	Mouse anti-Human CD279, Clone, MIH4	BD Pharmingen™
CD3	BV421	Mouse Anti-Human CD3, Clone SK7	BD Horizon™
CD4	BV510	Mouse Anti-Human CD4 Clone SK3	BD Horizon™
CD8	APC-Cy™7	Mouse Anti-Human CD8, Clone SK1	BD Pharmingen™
CD8	PE-Cy™7	Mouse Anti-Human CD8, Clone RPA-T8	BD Pharmingen™
CD25	PerCP-Cy™5.5	Mouse Anti-Human CD25, Clone M-A251	BD Pharmingen™
CD25	PE	Mouse Anti-Human CD25, Clone M-A251	BD Pharmingen™
CD28	FITC	Mouse Anti-Human CD28, Clone CD28.2	BD Pharmingen™
CD45	BV510	Mouse Anti-Human CD45, Clone HI30	BD Horizon™
CD45RO	APC	Mouse Anti-Human CD45RO, Clone UCHL1	BD Biosciences
CD45RA	APC-H7	Mouse Anti-Human CD45RA, Clone 5H9	BD Horizon™
CD62L	FITC	Mouse Anti-Human CD62L, Clone SK11	BD Biosciences
CD127	PE-Cy™7	Mouse Anti-Human CD127, Clone HIL-7R-M21	BD Pharmingen™
CCR7 (CD197)	PerCP-Cy™5.5	Mouse anti-Human CD197(CCR7), Clone 150503	BD Pharmingen™
PD-1 (CD279)	APC	Mouse anti-Human CD279 (PD-1), Clone MIH4	BD Pharmingen™
CTLA-4 (CD152)	PE	Mouse anti-Human CD2152 (CTLA-4), Clone BNI3	BD Pharmingen™
IFN-γ	PerCP-Cy™5.5	Mouse Anti-Human IFN-γ, Clone B27	BD Pharmingen™
IL-17	APC	Mouse Anti-Human IL-17, Clone N49-653	BD Pharmingen™
IL-10	FITC	Mouse Anti-Human IL-17, Clone JES3-9D7	Invitrogen™

Los distintos anticuerpos monoclonales marcados con diversos fluorocromos listados en la tabla fueron utilizados para los marcajes intra y extracelulares empleados en la caracterización celular.

Antígenos de superficie

Para la determinación/detección de antígenos en la superficie celular, se tomaron ≈ 200.000 células y se sometieron a un lavado con PBS, centrifugando a 600 g durante 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se añadieron 2 µl de cada uno de los

anticuerpos monoclonales de interés marcados con diferentes fluorocromos, en $\approx 100 \mu\text{l}$ de la suspensión celular y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS en exceso centrifugando a 600 g durante 5 minutos y finalmente se procedió a su lectura en el citómetro de flujo.

Antígenos intracelulares

Para la determinación de antígenos intracelulares, se cultivaron a $37^{\circ}\text{C} \approx 10^6$ células en placas de 24 pocillos con 1 ml de X-VIVO 15 – 2%HS añadiendo los estímulos inespecíficos PMA (50ng/ml, Sigma Aldrich), Ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma Aldrich) y el inhibidor del tráfico de las proteínas en el aparato de Golgi *BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor* (2 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$, BD Biosciences) y se incubaron durante 4 horas. A continuación, las células se lavaron con PBS en exceso a 600 g durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1ml de solución de fijación y permeabilización (BD Biosciences) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C . Posteriormente, el exceso de solución de fijación y permeabilización se descartó tras centrifugación a 600 g 5 minutos, se añadieron 10 μl de cada uno de los anticuerpos monoclonales de interés marcados con los fluorocromos y se incubaron durante 30 minutos a 4°C . Finalmente, las células se lavaron 2 veces con PBS en exceso a 600 g durante 5 minutos y se procedió a la adquisición y análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

Para la caracterización del inmunofenotipo de los TILs, los anticuerpos monoclonales utilizados fueron los detallados en la **tabla M1**.

1.2.1.3. Líneas tumorales (obtención y caracterización)

Una vez obtenida la suspensión celular a partir de la biopsia tumoral, una parte fue destinada a la expansión de células tumorales y la generación de líneas. Para ello, éstas se transfirieron a una placa de cultivo adecuada en función de la concentración celular, y se mantuvieron en cultivo con medio DMEM F12 suplementado según lo descrito en el apartado *1.1.4.2. de cultivos celulares (Líneas tumorales)*. Cuando se obtuvo un número suficiente, las líneas tumorales fueron criopreservados según lo descrito en el apartado *1.2 de cultivos celulares (criopreservación de células)*.

Para llevar a cabo los estudios de caracterización de las células tumorales, éstas fueron analizados mediante un panel de nanostring Oncomine 22 (NanoString Technologies, Inc), que analiza las mutaciones en 22 genes: AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SAMD4,

STK11, TP53. El análisis fue realizado en el CORE de Biología Molecular del Hospital Clínic de Barcelona.

También se llevaron a cabo tinciones de inmunohistoquímica de las células obtenidas, realizadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona, donde se analizaron la expresión de distintos marcadores epiteliales y mesenquimales.

1.2.1.4. Organoides

A partir de fragmentos obtenidos de la disgregación enzimática del tumor (de ≈ 1 mm), se incubaron 15 min en un baño a 37°C con 2 mL de PBS + 10% FBS suplementado con 40 μ L de Liberase™ (Sigma Aldrich, 50 μ g/ml). Tras la incubación, el sobrenadante fue filtrado (100 μ M).

El contenido obtenido fue diluido con 10 mL de PBS + 10% FBS y centrifugado a 1500 rpm 5 min. El pellet obtenido fue resuspendido en BME (Cultrex™ *basement membrane extracts*) frío y el contenido fue traspasado cuidadosamente, formando gotas (de 5- 30 μ L), a una placa a 37°C de 6 a 96 pocillos (dependiendo del nº de células, en una placa de 12 pocillos debe haber 150-200 x 10⁶ células/pocillo, **tabla M2**).

Tabla M2. Distribución del BME en los pocillos.

Tipo de placa (nº pocillos)	μ L de BME (por pocillo)
96	5 (1 gota)
48	20 (1 gota)
24	50 (2 gotas)
12	90 (10 gotas)
6	180 (2 gotas)

La placa con las gotas de BME fue incubada 15 min a 37°C para conseguir la solidificación del BME, tras o cual se añadió cuidadosamente el medio de cultivo Utrecht (ver **tabla M3**).

Las placas fueron incubadas a 37°C 5% CO₂ hasta que se obtuvo un nº suficiente de organoides para poder criopreservarlos.

Tabla M3. Reactivos necesarios para la preparación del medio completo Utrecht.

Reactivo	Dilución	Stock	Preparación	FOR 40 mL	Laboratorio
AdDMEM/F12	-	Listo para usar	-	40 mL	Life Technologies
HEPES	1:100	Listo para usar	-	400 µL	Life Technologies
Glutamax	1:100	Listo para usar	-	400 µL	Life Technologies
B27	1:500	Listo para usar	-	800 µL	Life Technologies
EGF	1:1000	50 µg/mL	500 µg EGF + 10 mL PBS 0,1% BSA	40 µL	Peprotech
R-Spondin1	1:1000	1 mg/mL	500 µg R-spon1 + 500 µL PBS	40 µL	SinoBiological
Nogging	1:1000	0,1 mg/mL	100 µg Noggin + 1mL H2O	40 µL	Peprotech
Nicotinamide	1:100	1M, 0.12 g/mL	1,2g NAM + 10mL PBS	400 µL	Sigma
Gastrin	1:50000	1 mg/mL	1mg Gastrin + 1 mL 0.1% NH ₄ OH	0.8 µL	Tocris
A83-01	1:50000	25 mM	10 mg + 948 µL DMSO	0.8 µL	Tocris
SB202190	1:10000	30 mM	5mg + 500 µl DMSO	4 µL	Sigma
PGE2	1:10000	100 µM	1mg + 100 µL Ethanol 100% (25mM) - Diluir este stock 1:250 en PBS 1X	4 µL	Sigma
N-ACC	1:400	500 mM	0,81 g + 10mL H2O	100 µL	Sigma
Y-27632	1:500	0.6 mg/mL	10 mg + 5.9 mL H2O	-	MedChem
Normocin	1:500	50 mg/mL	100 µg/mL	80 µL	Invivogen

1.2.1.5. Lisado tumoral (obtención e irradiación)

Una vez obtenida la biopsia tumoral, una parte fue destinada a la generación de un lisado, el cual sería utilizado para sensibilizar a las células dendríticas con antígenos tumorales y que estas células estimulasen a los linfocitos T para que desarrollasen una respuesta inmune anti-tumoral antígeno-específica.

Generación del lisado tumoral

El fragmento de la biopsia tumoral criopreservado a -80°C para la generación del lisado se sometió a un proceso de disgregación mecánica y enzimática como el descrito en el apartado 1.2.1.1. *Procesamiento de la biopsia*. Una vez obtenida la suspensión celular, ésta fue resuspendida en 1 ml de suero fisiológico y se procedió a un proceso de inactivación celular mediante shock térmico para lisar las células y dar lugar a restos celulares tumorales inviables, sin capacidad replicativa. Para ello, la suspensión celular se sometió a ciclos de congelación (mediante la introducción del criovial en nitrógeno líquido durante 5 minutos) y descongelación (mediante la introducción del criovial en baño a 37 °C durante 5 minutos), repitiendo ambos procesos 5 veces, para garantizar la falta de viabilidad de las células tumorales.

Irradiación del lisado tumoral

Una vez obtenido el lisado tumoral, éste fue sometido a un proceso de irradiación de 25 kGy en las instalaciones de la empresa especializada Aragamma, para garantizar la inviabilidad y la esterilidad de las células tumorales. Posteriormente, el lisado tumoral irradiado fue almacenado a -80°C hasta el momento de su utilización para pulsar las células dendríticas.

1.2.1.6. Sangre periférica (DCs y PBLs)

Para la generación de células dendríticas (DCs) y linfocitos de sangre periférica (PBLs) de los pacientes, se obtuvieron muestras de sangre periférica heparinizada mediante venopunción (≈ 40 ml). Las células dendríticas fueron obtenidas según lo descrito en el protocolo del apartado 1.1.1. *Obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica*. Una vez obtenidas, tanto los PBLs como las DCs se criopreservaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.1.2. *Criopreservación de células*.

2. Ensayo clínico

2.1. Diseño del ensayo clínico

Se trata de un estudio de brazo único fase I/II multicéntrico, abierto, con un sub-estudio traslacional, del tratamiento combinado de avelumab (Bavencio[®], anti-PD-L1) con una vacuna de células dendríticas autóloga (ADCV) en pacientes con cáncer colorrectal metastásico de tipo mismatch repair-proficient (MSS), refractarios a 2 o más líneas de tratamiento quimioterápico. El esquema del diseño del ensayo puede verse en la **figura M5**.

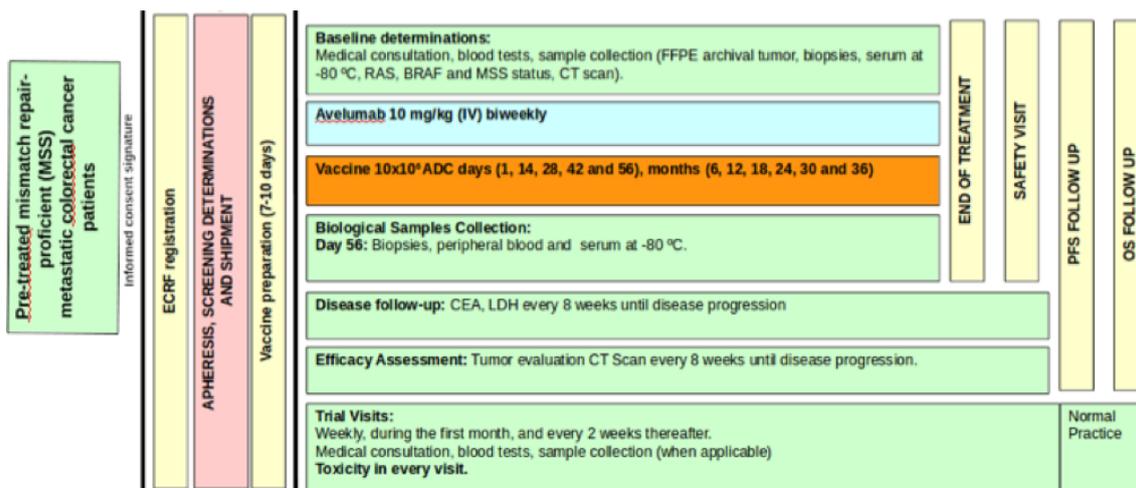


Figura M5. Diseño del ensayo clínico. El esquema representa el tratamiento y seguimiento realizado en los pacientes incluidos en el ensayo.

En la primera fase del estudio se hizo un escalado de dosis para evaluar el perfil de toxicidad del avelumab con la vacuna de células dendríticas autóloga (ADCV, *autologous dendritic cell vaccine*) para recomendar la dosis a utilizar en la fase II. En esta primera fase, 3 pacientes fueron tratados con avelumab 10 mg/kg cada 2 semanas durante 12 meses + 10×10^6 ADCV cada 2 semanas, 5 infusiones seguidas de 6 infusiones cada 6 meses. Puesto que ninguno de estos pacientes experimentó una toxicidad limitante, esta fue la dosis empleada en la fase II.

Durante el estudio, los participantes se sometieron a visitas de seguimiento semanales durante el primer mes de tratamiento y posteriormente cada 2 semanas.

La evaluación de la respuesta tumoral se realizó según los criterios revisados de respuesta en tumores sólidos (RECIST 1.1), cada 8 semanas, hasta progresión de la enfermedad. La toxicidad fue evaluada y registrada en cada visita utilizando la última versión de los criterios NCI-CTCAE.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento y valorar si esta terapia combinada tenía la eficacia suficiente como para incrementar la supervivencia libre de progresión en estos pacientes.

El objetivo del sub-estudio traslacional era identificar biomarcadores de respuesta al tratamiento y comprender mejor los cambios farmacodinámicos antes y después de recibir la terapia, por ello las muestras se obtuvieron antes y tras 8 semanas de haber iniciado el tratamiento.

Variable principal

En la fase I: determinar la dosis recomendada para ser aplicada en la fase II de la terapia combinada.

En la fase II: incrementar el porcentaje (de un 20% a un 40%) de pacientes libres de progresión a los 6 meses.

Variables secundarias

En la fase I: evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la terapia combinada.

En la fase II: evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la terapia combinada, identificar un fenotipo favorable para la eficacia del tratamiento y evaluar los cambios farmacodinámicos entre las biopsias tumorales pre-tratamiento y post-tratamiento.

Consideraciones éticas

Antes de la inclusión en el ensayo todos los pacientes firmaron, junto con el formulario de consentimiento informado, una “Hoja informativa para los participantes en el estudio”.

El ensayo clínico ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínic de Barcelona, así como por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPs). Se trataba de un ensayo sponsorizado por la asociación no-comercial Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo (GEMCAD). El estudio aparece en los siguientes registros:

- EUDRACT: 2016-003838-24.
- Clinicaltrials.gov: NCT03152565
- ReEC Registro Español de Ensayos Clínicos: 2016-003838-24.

2.2. Pacientes

El ensayo estaba destinado a pacientes con cáncer colorrectal metastásico de tipo MSS que hubieran recibido 2 o más líneas de tratamiento previas. Solamente aquellos pacientes que cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión fueron incluidos en el estudio. Previamente a su inclusión y a la realización de ninguna evaluación o procedimiento del ensayo, todos los pacientes firmaron el consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética.

Tabla M4. Criterios de inclusión y exclusión del ensayo clínico.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Obtención del consentimiento informado	Metástasis cerebrales
Diagnóstico histológico de CCR MSS	Trasplantes previos
Tratamiento previo con al menos 2 líneas de quimioterapia	Presencia de ascitis clínica
Edad \geq 2018 años	Score modificado de Charlson $>$ 2
ECOG $<$ 2	Infecciones agudas o crónicas significativas, incluyendo VIH, VHB y VHC
Enfermedad medible por criterios RECIST 1.1	Enfermedades autoinmunes activas
LDH $<$ 675 U/L	Hipersensibilidad previa a anticuerpos monoclonales, anafilaxis o asma no controlado
Función hepática adecuada, definida como: <ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina \leq 1.5 x límite superior de normalidad • AST y ALT \leq 2.5 x límite superior de normalidad • AST y ALT \leq 5 x límite superior de normalidad (en pacientes con metástasis hepáticas) 	Serologías positivas para HBsAg, Anti-HBc, VHB, VHC, VHC RNA, VIH-I RNA, Agp24 IIIIV + AC IIIIV ½, IgG antigen core v. hepatitis B, RPR (Ac reagínicos Lues-RPR), IgG cytomegalovirus, Ac anti HTLV I/II, Ac anti Trypanosoma Cruzi, Chagas
Función hematológica adecuada, definida como: <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina \geq 9 g/dL • Plaquetas \geq $100 \times 10^9/L$ • Neutrófilos \geq $1.5 \times 10^9/L$ 	Tratamiento con inmunosupresores, excepto: a)corticoides intanasales, tópicos, locales; b)corticoides sistémicos a dosis \leq 10 mg/día de prednisona o equivalente; y c) corticoides usados como pre-medicación para reacciones de hipersensibilidad
Función renal adecuada, con un aclaramiento de creatinina \geq 30 mL/min	Embarazo o lactancia
Test de embarazo negativo para mujeres en edad fértil	Abuso de drogas o alcohol
Utilización de medidas anticonceptivas durante el tratamiento y hasta 60 días después de haberlo finalizado	Otras enfermedades significativas que a criterio del investigador puedan interferir en la tolerancia al tratamiento
	Antecedentes de otras neoplasias en los 5 años previos

ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*; RECIST, *Response evaluation criteria in solid tumors*; LDH, lactato deshidrogenasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C;

HBsAg, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; anti-HBc, anticuerpo frente al antígeno core del VHB; HTLV, virus linfotrópico de células T humanas.

Todos los criterios de inclusión y exclusión están resumidos en la **tabla M4**. Entre los criterios de inclusión se incluyeron pacientes de edad igual o superior a 18 años, con estado funcional en la escala ECOG de 0 o 1, enfermedad medible por criterios RECIST 1.1, niveles de LDH < 675 U/L, adecuada función hepática, hematológica y renal y utilizar medidas anticonceptivas durante todo el período de tratamiento y en los 60 días siguientes tras la última administración de avelumab. Los criterios de exclusión incluyeron la presencia de metástasis cerebrales, haber recibido un trasplante previo, presencia de ascitis, infecciones activas o crónicas significativas, antecedentes de neoplasias en los 5 años previos, enfermedades autoinmunes, serologías positivas para VIH, VHB o VHC, embarazo o lactancia y cualquier proceso médico serio que a criterio del investigador pueda interferir en el desarrollo del estudio.

Los pacientes podían ser retirados del estudio si se cumplía alguno de los siguientes criterios: progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable, pérdida del seguimiento del paciente, eventos que pusieran en riesgo la seguridad del paciente, participación en otro ensayo clínico o deseo voluntario por parte del paciente.

2.3. Tratamientos del ensayo

El esquema de la elaboración y administración del tratamiento combinado del ensayo clínico puede verse en la **figura M6**.

2.3.1. Vacuna de células dendríticas autóloga

La vacuna (ADCV) consistió en células dendríticas maduras autólogas cargadas con antígenos tumorales autólogos. Ésta fue preparada a partir de una leucoaféresis y de una biopsia tumoral, siguiendo un protocolo como el descrito en el apartado *1.1.1. Obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica*. Los pacientes recibieron una dosis intradérmica conteniendo 10×10^6 células dendríticas, cargadas con el lisado tumoral, los días 1, 14, 28, 42 y 56 (un total de 5 dosis) y posteriormente una dosis de recuerdo cada 6 meses hasta progresión de la enfermedad (máximo 6 dosis adicionales).

2.3.2. Avelumab

El avelumab es un anticuerpo humano de isotipo IgG₁ que bloquea PD-L1. Los pacientes recibieron avelumab de manera intravenosa a una dosis de 10 mg/Kg de peso, cada 14 días, hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

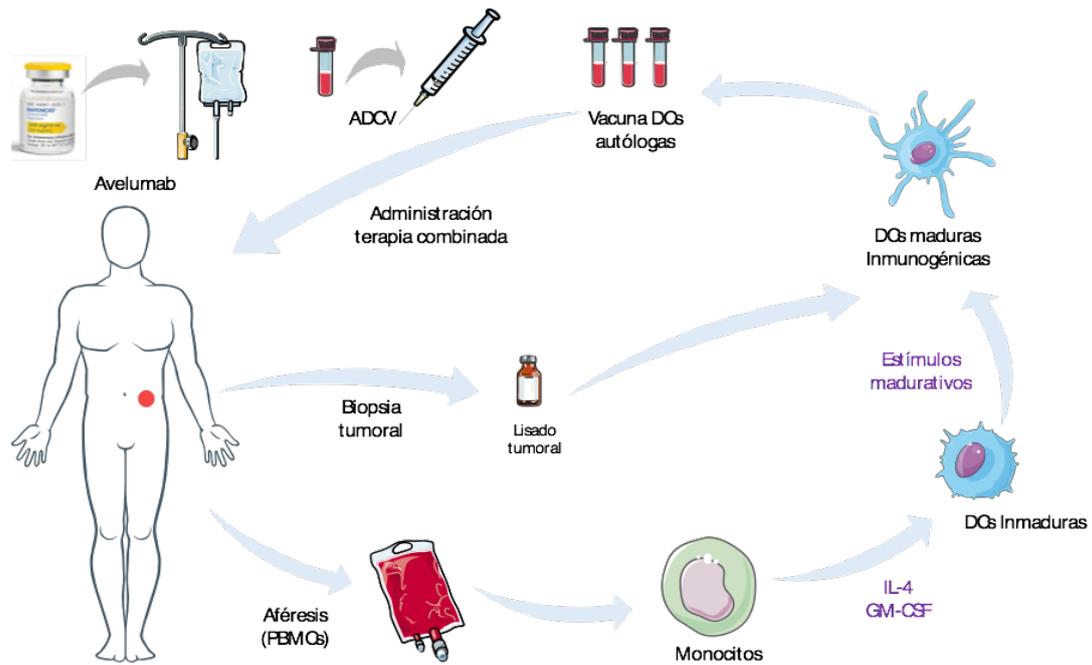


Figura M6. Esquema del ensayo clínico. DCs, células dendríticas; IL-4, interleukina 4; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; ADCV, *autologous dendritic cell vaccine*.

2.4. Monitorización de la respuesta inmunitaria a la terapia combinada

Uno de los puntos clave del presente trabajo es la monitorización de la respuesta inmunitaria de los pacientes frente a la terapia combinada, para evaluar la eficacia del tratamiento a la hora de estimular al sistema inmunitario y comprobar si esta activación tiene impacto en las respuestas clínicas. Así mismo, esta monitorización nos permitirá identificar biomarcadores predictores de la eficacia al tratamiento para mejorar la selección de pacientes.

2.4.1. Muestras obtenidas

Se obtuvieron muestras de biopsias tumorales y de sangre periférica de los pacientes antes de su entrada en el estudio y a los 2 meses (día 56) de haber comenzado el tratamiento.

2.4.1.1. Biopsias tumorales

Se obtuvieron muestras tumorales a partir de biopsias de tumor primario (obtenidas a través de colonoscopia) o de metástasis accesibles por punción ecográfica (lesiones hepáticas) o por TAC (lesiones pulmonares). Las biopsias obtenidas antes de entrar en el estudio en *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) fueron utilizadas para el diagnóstico de enfermedad de tipo MSS y para la determinación del *status* de RAS y BRAF, así como para la extracción de RNA, y aquellas obtenidas tras 2 meses de tratamiento para evaluar los cambios farmacodinámicos producidos por la terapia. También se utilizaron las biopsias obtenidas

antes de comenzar el tratamiento para generar el lisado tumoral destinado a la preparación de la ADCV.

2.4.1.2. Sangre periférica

Se obtuvieron 50 ml de sangre periférica previamente a la inmunización con la terapia combinada, así como a los 2 meses (día 56) para evaluar la respuesta inmunitaria al tratamiento.

De las muestras de sangre periférica, 10 ml de sangre coagulada se emplearon para conservar suero en alícuotas a -80°C para el posterior análisis de citocinas y 40 ml de sangre heparinizada se usaron para el aislamiento de PBMCs y el ulterior análisis de subpoblaciones linfocitarias.

2.4.2. Determinación de citocinas mediante LUMINEX (suero)

Para evaluar la respuesta inmunitaria de los pacientes tras haber recibido el tratamiento, se utilizó el método de LUMINEX, ya que es un microarray líquido que nos permite determinar simultáneamente los niveles de varias citocinas con un pequeño volumen de muestra (50 μl). El kit utilizado para medir niveles en suero de SDF1a (*Stromal cell-derived factor 1*, también conocido como CXCL12), interleukina 2 (IL-2), interleukina 6 (IL-6), interleukina 10 (IL-10), interleukina 17A (IL-17a), interleukina 23 (IL-23), interferón gamma (IFNg), MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1* también conocido como *Chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2), Fas ligando (FasL o CD95L), MMP-9 (*Matrix metalloproteinase 9*), RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, también conocido como *Chemokine (C-C motif) ligand 5-CCL5*) y VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*) fue ProcartaPlex Luminex™ xMAP (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

Las 16 citocinas analizadas en las muestras pre- y post-tratamiento se muestran en la **figura M7**.

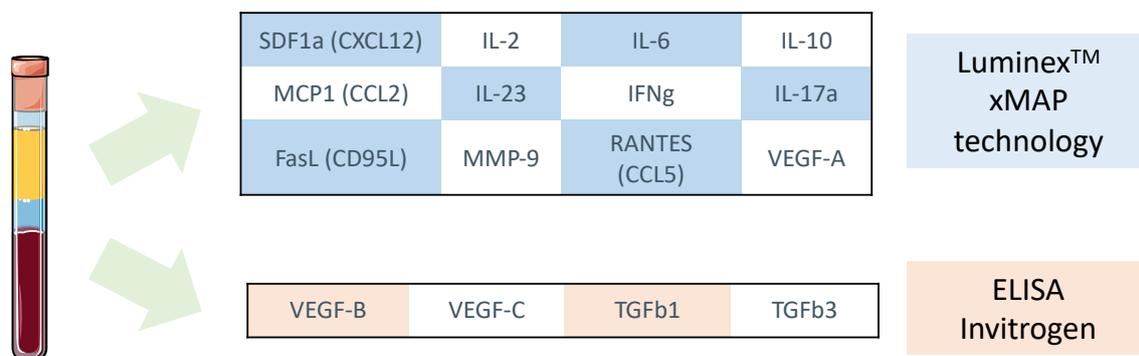


Figura M7. Esquema de las 16 citocinas analizadas en suero de pacientes incluidos en el ensayo clínico. Se analizaron muestras pre y post-tratamiento (día 56).

La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El resumen del ensayo es el siguiente:

- Se humidificó la placa añadiendo 200 μ l de *working wash solution* a cada pocillo y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró la *working wash solution* y se añadieron 25 μ l de la solución que contenía los beads a cada pocillo.
- La placa se lavó 3 veces con 200 μ l de *working wash solution* por pocillo.
- Se añadieron 50 μ l del tampón de incubación a cada pocillo, así como 100 μ l de los estándares y 50 μ l de las muestras en los pocillos correspondientes.
- La placa se mantuvo en agitación (600 rpm), a 4°C, durante 16 – 19h.
- Se lavó la placa 3 veces con 200 μ l de *working wash solution*.
- Se añadieron 100 μ l de la solución *Biotinylated detector antibody* y se incubó durante 1 hora en agitación (600 rpm) a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 3 veces con 200 μ l de *working wash solution*.
- Se añadieron 100 μ l de la solución *streptavidin-RPE* y se incubó durante 30 minutos en agitación (600 rpm) a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 3 veces con 200 μ l de *working wash solution*.
- Se resuspendieron las beads en 100 μ l de *working wash solution* y se agitó la placa durante 2-3 min (600 rpm).
- Se realizó la lectura en el analizador Luminex® 200TM y la adquisición de datos en el software xPONENT®.

Para determinar los niveles en suero de VEGF-B (*Vascular endothelial growth factor B*), VEGF-C (*Vascular endothelial growth factor C*), TGFb1 (*Transforming growth factor beta 1*) y TGFb3 (*Transforming growth factor beta-3*) se utilizaron kits de ELISAs comerciales (Wuhan Fine Biotech CO., Ltd y Invitrogen ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones correspondientes del fabricante.

2.4.3. Ensayos de proliferación celular con timidina tritiada

Para estudiar la capacidad de la ADCV para estimular de manera antígeno-tumoral-específica a los linfocitos T de los pacientes, se realizaron cultivos mixtos con linfocitos T de sangre periférica y células dendríticas de los pacientes y se midió la capacidad proliferativa de estos linfocitos tras estar en contacto con los antígenos del lisado tumoral presentados por las células dendríticas.

Adicionalmente, también se estudió el efecto sinérgico de la terapia combinada con el bloqueante de PD-L1 (10 µg/mL), añadiéndolo al cultivo. Se utilizaron muestras de pacientes antes y después de haber recibido el tratamiento, comparando el efecto de cada una de las terapias (ADCV y avelumab) individual y conjuntamente (**figura M8**). Los linfocitos T utilizados se obtuvieron a partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica y las células dendríticas (cargadas o no con el lisado tumoral) de las muestras criopreservadas durante la preparación de las vacunas.

En procedimiento llevado a cabo es el que se describe en el apartado 1.1.4.3. de cultivos celulares (*Ensayos de proliferación celular con timidina tritiada*).

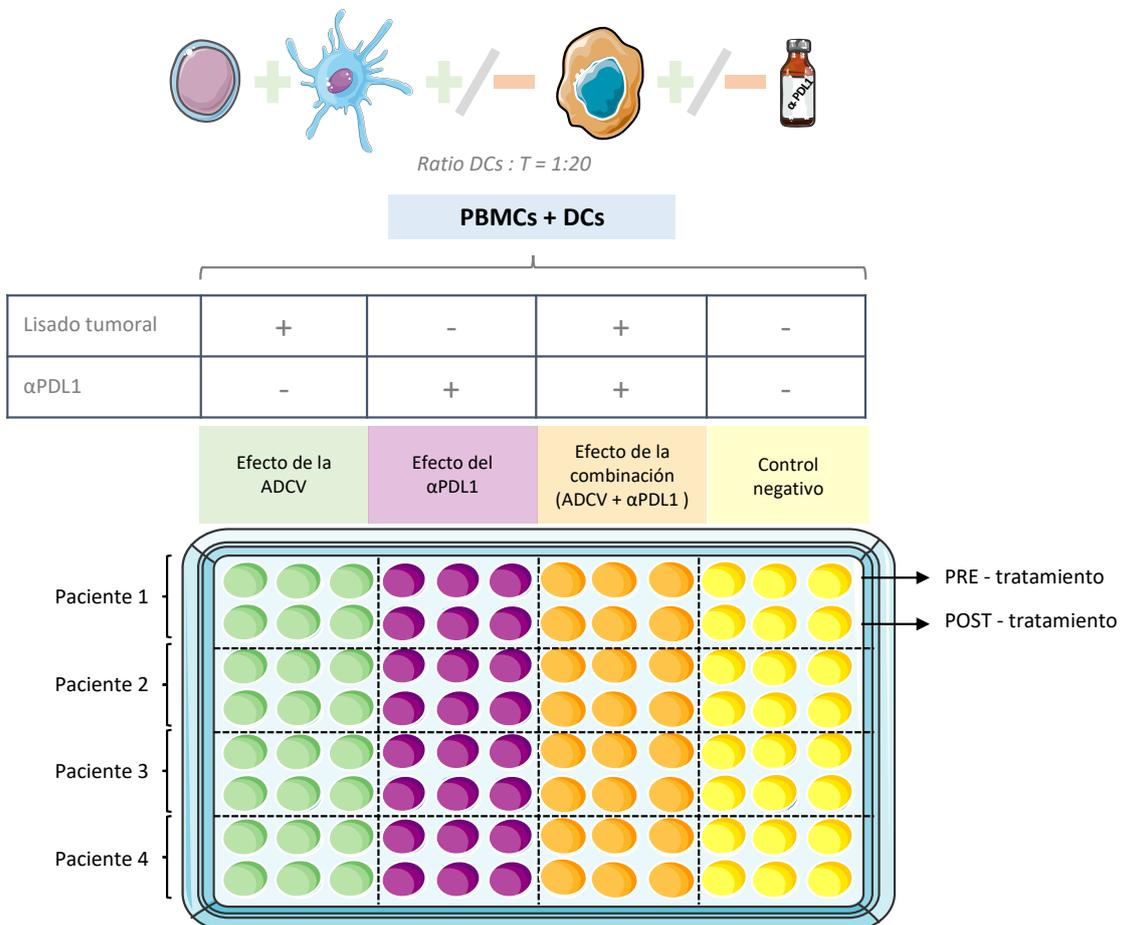


Figura M8. Ensayos de proliferación celular. Se realizaron co-cultivos de linfocitos T (2×10^5 células/pocillo) con células dendríticas (5×10^3 células/pocillo) cargadas o no con lisado tumoral, en medio X-VIVO + 2% suero AB humano, en presencia o ausencia de anti-PD-L1 (α PDL1). Los linfocitos proveína de muestras de sangre de pacientes obtenidas pre- y post-tratamiento. Cada condición se realizó por triplicado

2.4.3.1. Determinación de citocinas mediante ELISA en los sobrenadantes de las proliferaciones linfocitarias

El sexto día de cultivo del ensayo de proliferación celular con timidina tritiada, se recogieron los sobrenadantes de las placas de cultivo y se guardaron a -20°C para la determinación de las citocinas producidas por los linfocitos T frente a las diferentes condiciones del cultivo. Mediante distintas técnicas de ELISA, se analizaron los niveles de IFN γ e IL-10 (eBioscience).

La técnica fue realizada siguiéndolas instrucciones del fabricante. El resumen del protocolo fue el siguiente:

- Se sensibilizó la placa de ELISA mediante la adición de 100 μL del anticuerpo de captura y se incubó a 4°C durante toda la noche.
- Se lavó la placa 5 veces con 200 μL de tampón de lavado (PBS + 0,05% Tween).
- Se bloqueó la placa con 200 μL del diluyente del ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con 200 μL de tampón de lavado.
- Se añadieron 100 μL de cada uno de los estándares o muestras a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con 200 μL de tampón de lavado.
- Se añadieron 100 μL del anticuerpo de detección y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con 200 μL de tampón de lavado.
- Se añadieron 100 μL de solución de revelado (estreptavidina-HRP) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con 200 μL de tampón de lavado.

- Se añadieron 100 μL de solución de sustrato y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 50 μL de solución stop y se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm.

2.4.4. Estudio de subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)

Para evaluar el incremento de actividad del sistema inmunitario en respuesta a la inmunoterapia antitumoral, se estudiaron diferentes subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica mediante el análisis de la expresión de diversos marcadores celulares de superficie, en muestras de PBMCs de pacientes obtenidas antes y tras 56 días de haber recibido el tratamiento.

Todas las muestras se analizaron de manera simultánea, para evitar variabilidades interensayo. Las PBMCs fueron descongeladas según el protocolo detallado en el apartado 1.3 de cultivos celulares (*Descongelación de células*) y dejadas *overnight* en medio de cultivo X-VIVO 15-2% HS a una concentración $\approx 1 \times 10^6$ células/ml. A continuación, se lavaron con PBS en exceso a 600 g durante 5 minutos y se procedió a la determinación de los distintos marcadores celulares según el protocolo descrito en el apartado 1.2.1.2 (*Marcaje y detección de antígenos celulares mediante citometría de flujo*) y al posterior análisis de las distintas subpoblaciones (**tabla M5**).

Tabla M5. Listado de anticuerpos monoclonales utilizados en la determinación de las subpoblaciones linfocitarias en PBMCs.

Marcador	Fluorocromo	Descripción	Laboratorio
CTLA-4 (CD152)	PE	Mouse Anti-Human CD152, Clone BNI3	BD Pharmingen™
PD-1 (CD279)	APC	Mouse anti-Human CD279, Clone, MIH4	BD Pharmingen™
CD3	BV421	Mouse Anti-Human CD3, Clone SK7	BD Horizon™
CD4	BV510	Mouse Anti-Human CD4 Clone SK3	BD Horizon™
CD8	APC-Cy™7	Mouse Anti-Human CD8, Clone SK1	BD Pharmingen™
CD8	PE-Cy™7	Mouse Anti-Human CD8, Clone RPA-T8	BD Pharmingen™
CD25	PerCP-Cy™5.5	Mouse Anti-Human CD25, Clone M-A251	BD Pharmingen™
CD25	PE	Mouse Anti-Human CD25, Clone M-A251	BD Pharmingen™
CD28	FITC	Mouse Anti-Human CD28, Clone CD28.2	BD Pharmingen™
CD45	BV510	Mouse Anti-Human CD45, Clone HI30	BD Horizon™
CD45RO	APC	Mouse Anti-Human CD45RO, Clone UCHL1	BD Biosciences
CD45RA	APC-H7	Mouse Anti-Human CD45RA, Clone 5H9	BD Horizon™
CD62L	FITC	Mouse Anti-Human CD62L, Clone SK11	BD Biosciences
CD127	PE-Cy™7	Mouse Anti-Human CD127, Clone HIL-7R-M21	BD Pharmingen™
CCR7 (CD197)	PerCP-Cy™5.5	Mouse anti-Human CD197(CCR7), Clone 150503	BD Pharmingen™

2.4.5. Estudio del fenotipo de las células dendríticas

El análisis fenotípico de las células dendríticas contenidas en la vacuna terapéutica administrada a los pacientes se realizó mediante citometría de flujo, utilizando los marcadores listados en la **tabla M6**. Se analizaron distintos marcadores de activación (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR) para evaluar el grado de activación y maduración de las células cargadas con los antígenos tumorales.

Tabla M6. Listado de anticuerpos monoclonales utilizados en el análisis del fenotipo de células dendríticas.

Marcador	Fluorocromo	Descripción	Laboratorio
CD80	PE	Mouse Anti-Human CD80, Clone L307.4	BD Pharmingen™
CD83	PE	Mouse Anti-Human CD83, Clone HB15e	BD Pharmingen™
CD86	PE	Mouse Anti-Human CD86, Clone 2331	BD Pharmingen™
HLA-DR	PE	Mouse Anti-Human HLA-DR, Clone G46-6	BD Pharmingen™
CCR7 (CD197)	PE	Mouse Anti-Human CCR7, Clone 2-L1-A	BD Pharmingen™

2.4.6. RNAseq: *immune signatures*

Se realizó el análisis RNA en aquellos pacientes en los que estaba disponible. El RNA procedente de las biopsias tumorales fue purificado utilizando RNeasy Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los análisis de firmas de expresión génica se realizaron en colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr Timothy Thompson.

Una vez obtenido el DNA, se preparó una librería mediante NGS a través del laboratorio Macrogen, Inc. y se procedió al análisis de la expresión de los diferentes genes y de las firmas de expresión inmunes. El control de calidad se realizó con el software FASTQ. Las secuencias adaptadoras se eliminaron con FASTP. El paquete STAR se usó para mapear secuencias al genoma de referencia GRCh38 de Ensembl y obtener el número de lecturas por gen. La expresión génica se normalizó utilizando la transformación de estabilización de varianza implementada en el paquete DESeq2 para R. Esta expresión génica normalizada fue utilizada para analizar dos firmas de expresión génica. En primer lugar, se analizó una firma previamente publicada (GEP, *gene expression profile*) (356), con un perfil de expresión de inflamación de linfocitos T. En segundo lugar, se analizó una firma de 10 genes generada *in house* (IMMETCOLS, *immune-metabolic signature*) que discrimina a los pacientes a través del tipo de tumor en 3 clústeres inmuno-metabólicos distintos.

2.4.7. Tipificación HLA

Se realizó la evaluación de HLA (*human leukocyte antigen*) en muestras de PBMCs de los pacientes del ensayo. Los alelos estudiados fueron HLA-A, B, C, DR y DQ, utilizando la tecnología PCR-SSO (*sequence specific oligonucleotides*) para su tipificación. La PCR-SSO consiste en la amplificación de los *loci* HLA mediante PCR con la subsiguiente hibridación del producto amplificado con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica marcadas con fluorocromos. Para ello, 20 – 80 ng de DNA fueron amplificados e hibridados con los *primers* y sondas de los kits *Lifecodes HLA eRes Typing kit* (GenProbe) siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad media de fluorescencia (MFI) fue determinada mediante un equipo Luminex® 200TM y el análisis se llevó a cabo mediante el programa Matchit!®DNA (lifecodes).

2.5. Evaluación de la eficacia clínica del tratamiento

Para evaluar la respuesta clínica al tratamiento, se realizaron determinaciones basales (dentro de los 28 días anteriores a la inclusión), previas al tratamiento (dentro de los 7 días anteriores al inicio del tratamiento) y en diferentes momentos a lo largo del tratamiento

(semanalmente durante el primer mes y posteriormente cada 8 semanas hasta progresión de la enfermedad), conforme a los criterios RECIST 1.1.

2.5.1. Evaluación tumoral

Tras la evaluación basal, las subsiguientes evaluaciones se realizaron siguiendo los criterios RECIST 1.1 de manera sistemática cada 8 semanas (\pm 1 semana) hasta progresión tumoral. Para ello, se realizaron tomografía computarizada (TAC) de tórax y región abdominopélvica, examen físico y análisis sanguíneo de proteína C reactiva (PCR), antígeno carcinoembrionario (CEA *carcinoembriogenic antigen*) y lactato deshidrogenasa (LDH).

Los criterios RECIST 1.1 se usaron para evaluar la respuesta de los pacientes al tratamiento determinando los tiempos de supervivencia libre de progresión (PFS, *progression free survival*), categorizando la respuesta tumoral objetiva de la siguiente manera:

- Respuesta completa (CR, *complete response*).
- Respuesta parcial (PR, *partial response*).
- Enfermedad estable (SD, *stable disease*).
- Progresión de la enfermedad (PD, *progression of disease*).
- No evaluable (NE).

La progresión de la lesión diana se calculó en comparación al momento en el cual la carga tumoral fue mínima (es decir, la suma más pequeña de diámetros registrados previamente en el estudio). En ausencia de progresión, se calculó la respuesta tumoral (CR, PR, SD) en comparación con las mediciones tumorales basales obtenidas antes de la inclusión.

2.5.2. Hiperprogresión tumoral

Debido a la falta de consenso en lo relativo a la hiperprogresión tumoral (HPD, *hyperprogression disease*), y considerando los criterios descritos por otros autores (356–359), el equipo multidisciplinar en nuestra institución definió HPD siguiendo estos criterios:

- Progresión de la enfermedad en la primera evaluación (8 semanas tras haber recibido la primera dosis del tratamiento).
- Incremento de > 50% de tamaño en las lesiones diana entre la determinación basal y la primera evaluación radiológica.
- Niveles de LDH > 2 veces el límite superior de normalidad (upper limit normal, ULN < 234 U/mL)

- Deterioro clínico con un incremento del estado funcional ECOG > 2 durante las primeras 8 semanas del tratamiento.

En los pacientes que cumplieron al menos 3 de los criterios anteriormente mencionados, se definió que presentaban HPD, mientras que en aquellos que cumplieron menos de 3 de estos criterios se les consideró como PD.

2.6. Estadística

Con el diseño minimax de dos etapas de Simon, el estudio se planteó para reclutar a 33 pacientes y detectar un incremento del 20% en la PFS a los 6 meses

La PFS y la supervivencia global (OS, *overall survival*) fueron analizadas con las curvas de Kaplan-Meier y comparadas con un log-rank test estratificado. Ajustamos el modelo de regresión de Cox para OS y PFS. El análisis se realizó con el software estadístico R.

Para comparar dos grupos independientes se usó la prueba paramétrica t-Student. Para las distribuciones no normales se usaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis, U-Mann-Whitney o Wilcoxon. Para comparar tres o más grupos independientes se usó el análisis de la varianza (ANOVA). En ambos análisis se consideraron diferencias significativas aquellos valores de p inferiores a 0.05, representando con * si $p < 0.05$; ** si $p < 0.01$ y *** si $p < 0.001$. En los gráficos se representa la desviación estándar (SD). Los cálculos para estos análisis estadísticos se hicieron utilizando el software Prism versión 8.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

IV. Resultados

Los resultados expuestos en la presente tesis se han estructurado en dos grandes bloques: por un lado la parte pre-clínica, donde se estudió en primer lugar la inmunogenicidad de la combinación de células dendríticas y bloqueantes de las vías inhibidores mediante la respuesta alogénica y en segundo lugar la inmunogenicidad en el contexto del cáncer colorrectal y la caracterización del microambiente tumoral en este tipo de cáncer; y por otro lado el uso en un ensayo clínico de estas dos terapias combinadas, tanto a nivel *in vitro* (basado en la monitorización de la respuesta inmunitaria) como a nivel clínico (basado en la evaluación de la respuesta al tratamiento). En base a estos apartados que se sucedieron de forma cronológica, se exponen a continuación los resultados obtenidos.

1. Pre-clínica:

1.1. Estudios de inmunogenicidad *in vitro*

A pesar del amplio uso de las vacunas de células dendríticas en el tratamiento de diversos tumores, la eficacia clínica que han mostrado hasta la fecha ha sido limitada (297). La aparición de los *immune checkpoints inhibitors* (ICI) ha revolucionado el tratamiento contra el cáncer, logrando respuestas prometedoras en tumores hasta ahora considerados incurables (233), sin embargo, existen diversos tipos de tumores en los cuales resultan ineficaces (234). La respuesta alogénica generada por las células dendríticas depende mayoritariamente de la expresión de moléculas coestimuladoras, por ello la presencia de ICI puede suprimir los mecanismos bloqueantes que inhiben la respuesta de los linfocitos T. Por este motivo, el primer objetivo que nos planteamos fue analizar *in vitro* el efecto de la combinación de estas dos aproximaciones (células dendríticas con un inhibidor de la vía PD-1/PD-L1).

Este planteamiento se llevó a cabo mediante ensayos de proliferación celular, en los cuales se utilizaron como células efectoras PBMCs de donantes sanos y se evaluó la capacidad de las DCs maduras (de otros donantes sanos no relacionados) de generar una respuesta alogénica. También se añadió un inhibidor de PD-L1 (en este caso, atezolizumab) para ver el efecto combinado de ambas aproximaciones y así poder compararlo con el efecto individual de cada una de ellas (**figura R1**). Las DCs se cargaron con distintos neoantígenos tumorales. También se analizaron las concentraciones de INF- γ en el sobrenadante de estos cultivos.

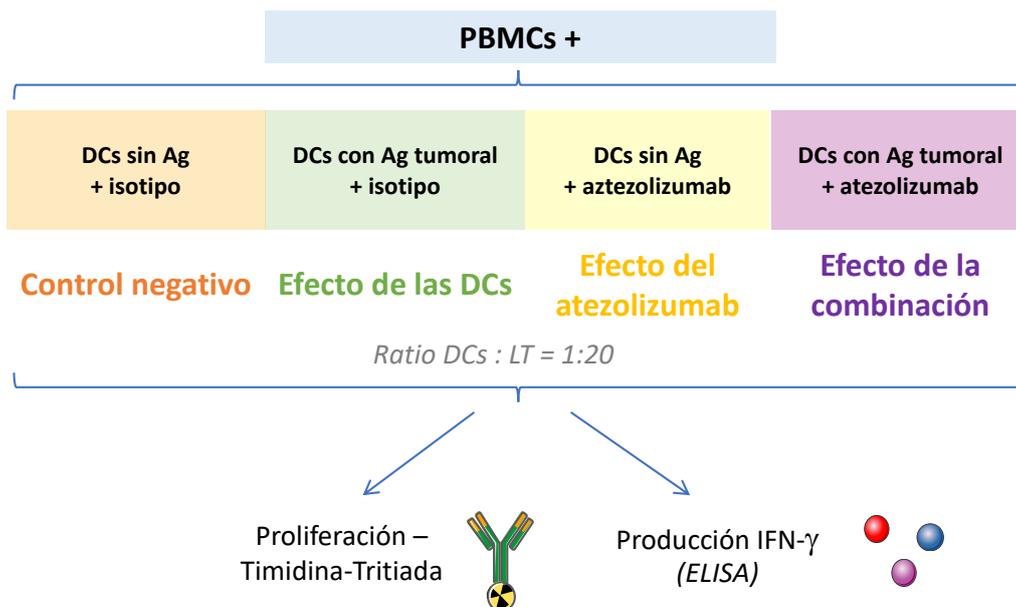


Figura R1. Experimento para estudiar la respuesta alérgica *in vitro*. DCs, células dendríticas; LT, linfocitos T.

Se analizaron los datos de proliferación celular autóloga en 12 pacientes, con DCs cargadas con 3 neoantígenos tumorales diferentes (prot, pept 13 y pept 19), observando los cpm de cada paciente en cada una de las condiciones de cultivo:

1. DCs cargadas con los diferentes neoantígenos + isotipo
2. DCs cargadas con los diferentes neoantígenos + atezolizumab
3. DCs sin péptidos (control negativo) + isotipo
4. DCs sin péptidos (control negativo) + atezolizumab

En las siguientes gráficas (**figura R2A**) pueden verse los resultados de proliferación y producción de IFN- γ de cada uno de los pacientes analizados. Se puede observar como las DCs tienen la capacidad de generar una respuesta inmune mayor en presencia de atezolizumab en la mayoría de los pacientes evaluados (9/12, 75%). Los resultados se correlacionan con los niveles de IFN- γ de los sobrenadantes analizados.

También se realizó el mismo experimento con DCs y PBLs alogénicas. El efecto observado fue el mismo, con un incremento en la proliferación y la liberación de IFN- γ en presencia de atezolizumab, comparado con el efecto sólo de las DCs (**figura R2B**).

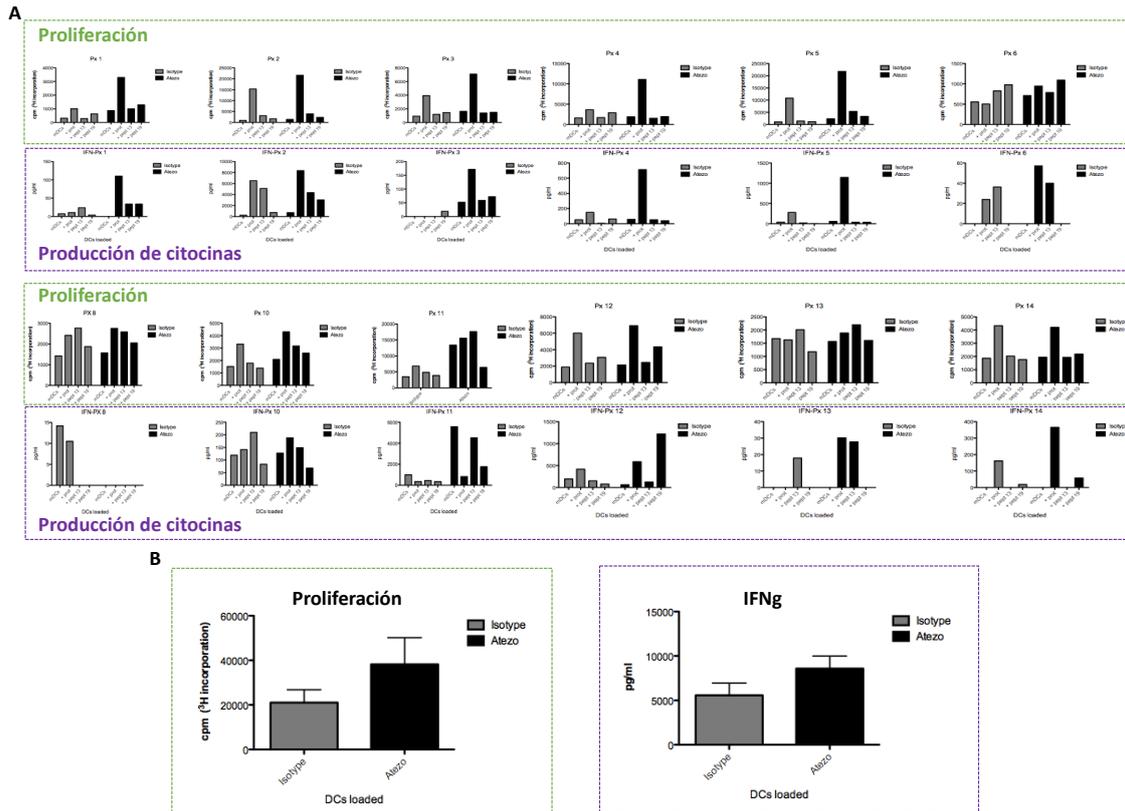


Figura R2. Análisis de la respuesta inmune generada por las células dendríticas (DCs), en combinación con anti-PDL-1 (atezolizumab). Datos individuales de respuesta autóloga (A) y de respuesta alogénica (B). Datos de proliferación con timidina tritiada (cpm, en verde) y de producción de citocinas (INF- γ , pg/mL, en morado).

Para poder analizar todos los pacientes de manera global, se calculó el índice de estimulación (SI, stimulation index), dividiendo los cpm de las proliferaciones con cada neoantígeno entre las cpm del control negativo (DCs sin péptidos tumorales). (**Figura R3**).

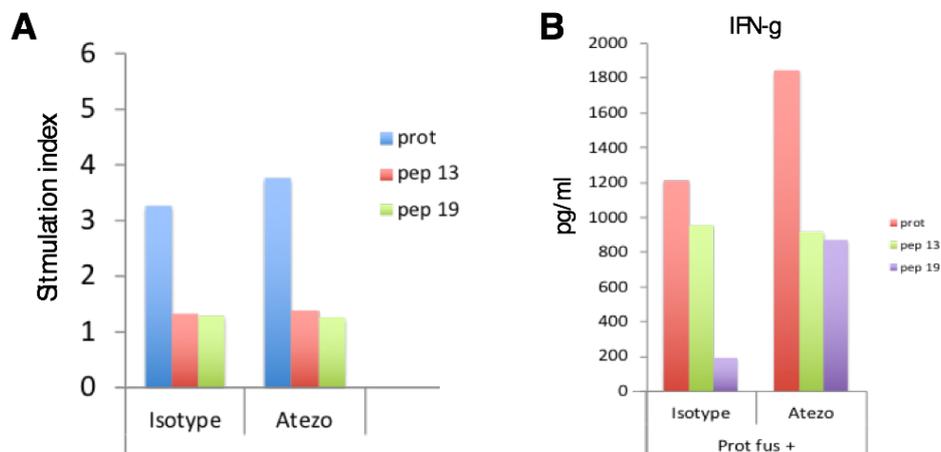


Figura R3. Análisis global de la respuesta autóloga generada por las DCs, en combinación con anti-PDL1. Datos de proliferación (A) y producción de INF- γ (B). *Stimulation index* (SI)= *Specific proliferation DC (Ag) / Non-specific proliferation DC (negative control)*.

1.2. Caracterización del microambiente tumoral en pacientes con CCR

Una vez demostrada la capacidad sinérgica de las células dendríticas y los ICI para estimular a los linfocitos T, nos propusimos estudiar este efecto en las propias células de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, así como profundizar en la respuesta inmunitaria y en el microambiente tumoral de este tipo de pacientes, de cara a una posible aplicación clínica de este tipo de terapia combinada.

1.2.1. Características de los pacientes

Desde enero de 2018 hasta abril de 2021, 32 pacientes fueron incluidos en el estudio pre-clínico. Se trataba de pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico (CCRm) que no habían recibido ningún tratamiento previo a la extracción de las muestras del estudio y que habían firmado el consentimiento informado.

De los 32 pacientes incluidos, en 10 de ellos se obtuvieron, además de las muestras iniciales, muestras apareadas tras haber progresado a la primera línea de tratamiento. Todas estas muestras fueron utilizadas para el estudio del microambiente tumoral en estos pacientes.

1.2.2. Biopsias tumorales

Para poder estudiar el microambiente tumoral del CCRm y la potencial eficacia de la terapia combinada con DCs e ICI, se llevó a cabo la optimización del protocolo para la generación de TILs, líneas y lisados tumorales a partir de las biopsias tumorales extraídas mediante endoscopia. Las muestras totales obtenidas de los 32 pacientes incluidos en el estudio fueron 42 biopsias tumorales, 22 de ellas pertenecientes a 22 pacientes en los cuales sólo se obtuvo muestra antes de comenzar el tratamiento del CCRm y otras 20 biopsias correspondientes a 10 pacientes de los que se disponía de muestras antes y después de haber recibido el tratamiento de primera línea y haber progresado.

Tras la recogida de las biopsias tumorales en un tubo con medio adecuado, éstas fueron transportadas hasta la sección de inmunoterapia del Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB), del Hospital Clínic de Barcelona, donde fueron procesadas para la generación de TILs, líneas tumorales y lisados tumorales para ser usados junto con las DCs.

1.2.2.1. Obtención y caracterización de TILs

Los linfocitos T juegan un papel muy importante en la respuesta anti-tumoral del sistema inmunitario para poder eliminar de manera efectiva las células tumorales. A pesar de la

situación anatómica del CCR en un entorno altamente infiltrado, el CCR se caracteriza a menudo por presentar un fenotipo poco inmunogénico, lo que dificulta el reconocimiento y eliminación de las células tumorales, así como su evolución hacia un cáncer de tipo metastásico. Esto puede ser debido a la entrada en juego de moléculas inhibitoras, tanto las que se expresan en las propias células tumorales (PD-L1, IDO, TIM1, galectin-9...) como las de células del sistema inmunitario, como los linfocitos T caracterizados por la expresión de marcadores de agotamiento celular (PD1, CTLA-4, TIM3, LAG3...). Debido a esto, es importante caracterizar en profundidad el tipo de linfocitos T que se encuentran infiltrando el tumor (TILs) para ver como se correlaciona con las respuestas clínicas, así como utilizar estos TILs para analizar in vitro su capacidad para ser estimulados en respuesta a distintos tipos de tratamientos antitumorales.

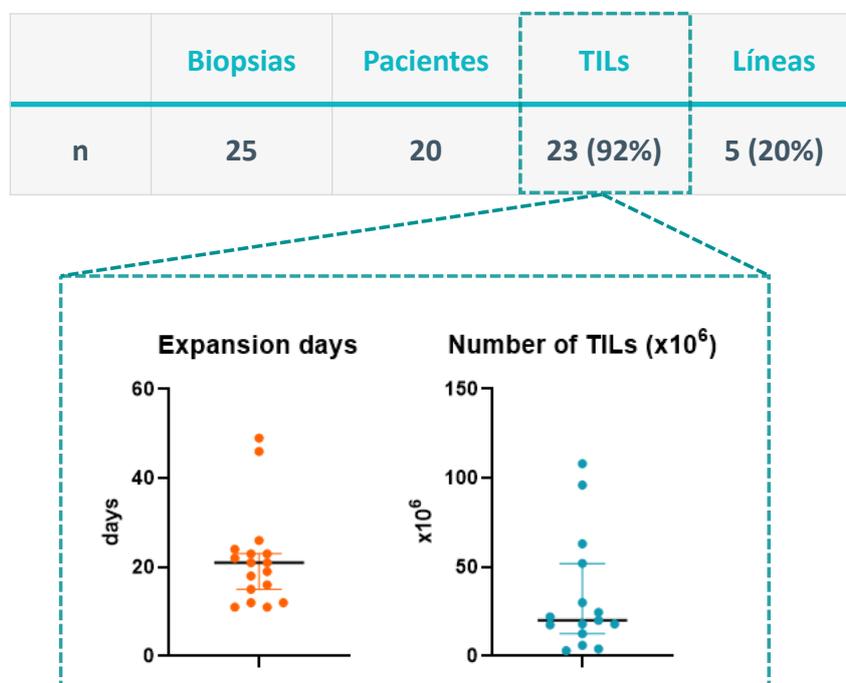


Figura R4. Obtención de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) a partir de biopsias de cáncer colorrectal metastásico. Se muestran el tiempo de expansión en cultivo (días) y el nº obtenido.

De las 42 muestras procesadas, se consiguió generar TILs en 38 de ellas (90%). Tras 2 semanas de expansión en cultivo, se obtuvo un mínimo de 4×10^6 células, con una media de expansión de $35,3 \times 10^6$ en un rango de 4 a 108 millones de TILs (**figura R4**).

Una vez obtenidos los TILs, se procedió a su caracterización (**figura R5**). Para ello, se realizó un fenotipo mediante citometría de flujo para ver la expresión extracelular de los marcadores CD3, CD4, CD8, PD-1 y CTLA-4. Como puede verse en la **figura R5B**, se encontró un gran predominio de la población CD4 con respecto a las CD8 (91,7% vs 5,55%). En cuando a la

expresión extracelular de los marcadores de agotamiento celular (**figura R5D**), se encontraron unos niveles de PD-1 y de CTLA4 del 2% y el 1%, respectivamente, siendo bastante similar tanto en CD4 como en CD8.

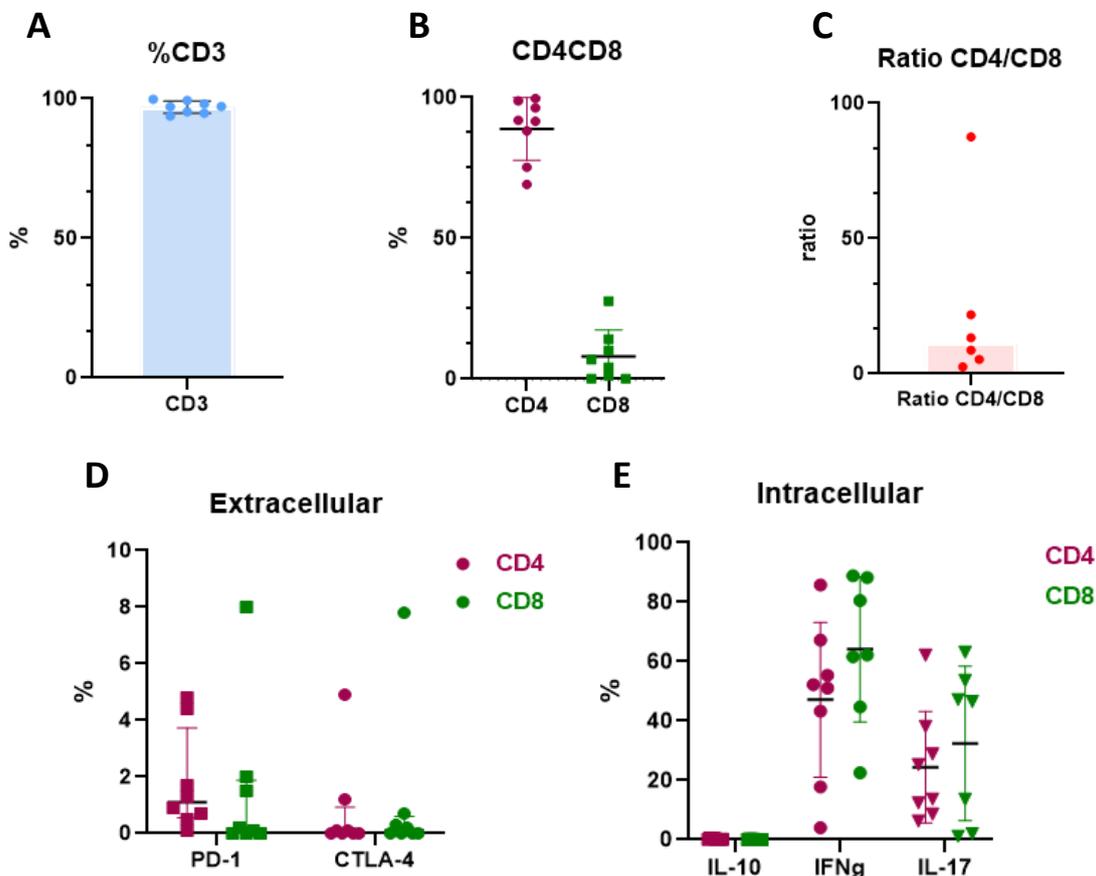


Figura R5. Fenotipo extracelular de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) obtenidos de las biopsias en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Porcentaje de CD3 (A); % de linfocitos CD4 y CD8 (B); ratio CD4/CD8 (C); marcadores de *exhaustion* a nivel extracelular (D); fenotipo intracelular de los TILs (E).

Además de la expresión extracelular de los marcadores anteriormente mencionados, también se llevó a cabo un estudio de subpoblaciones linfocitarias para determinar la polarización de la respuesta adaptativa llevada a cabo por los linfocitos del microambiente tumoral (Th1/Th17 vs Th2/Treg), por lo que se realizaron estudios de detección de antígenos intracelulares para caracterizar su perfil de producción de citocinas (**figura R5E**).

No se detectó expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (< 0,2%), mientras que la expresión de IFN-g (47,8% de los TILs CD4+ y el 71% de los TILs CD8+) era el doble con respecto a la de IL-17 (21,2% de los CD4+ y el 37,5% de los CD8+). Por lo tanto, los TILs exhibían un perfil de tipo Th1 (IL-17-IFN-g+).

Si bien es cierto que este fenotipo de los TILs no refleja de manera precisa su presencia in vivo en el tumor debido a la expansión de las células y, ya que la expresión de los distintos marcadores de los linfocitos T pueden variar a lo largo del mantenimiento de los mismos en cultivo, nos encontramos con la limitación de no tener un número suficiente de células con el que poder determinar este fenotipo en el momento de obtención de la muestra tumoral, ya que la misma muestras se requiere simultáneamente no sólo para el aislamiento de los TILs, si no también para la obtención de líneas y lisados tumorales. Debido al tamaño limitado de la biopsia tumoral, nos vimos obligados a realizar una expansión celular previa para obtener un número suficiente de células con el que poder llevar a cabo el inmunofenotipo.

1.2.2.2. Obtención y caracterización de líneas tumorales

Las DCs diferenciadas ex vivo y cargadas con péptidos sintéticos, lisados de células tumorales autólogas y/o alogénicas o células tumorales autólogas inactivadas por irradiación, se han usado en el tratamiento de distintas neoplasias, aunque los resultados clínicos globalmente se limitan al 10-20% de respuestas. Unos de los aspectos que requiere optimización en este tipo de estrategias terapéuticas es la selección adecuada de la fuente de antígenos tumorales, siendo un punto clave para que la respuesta inmunitaria sea eficaz en el control de la expansión tumoral. La utilización de antígenos autólogos supone la obtención, mediante biopsia o muestra quirúrgica, de tejido tumoral que, inactivado, pueda ser utilizado para la composición de una vacuna. A pesar de la ventaja que ofrece inmunizar contra el tumor del propio paciente que implica la disponibilidad de una gran parte de los antígenos tumorales propios, existe algunos inconvenientes, como la dificultad para acceder al tumor, la aparición de neoantígenos, o mecanismos de tolerancia que imposibilitan la acción de los linfocitos T.

La posibilidad de utilizar una mezcla de antígenos tumorales provenientes de líneas tumorales estables garantiza: una fuente de antígenos tumorales homogénea para el desarrollo de los ensayos clínicos; al ser un producto alogénico hace que éste sea más inmunogénico que uno autólogo; y la presencia de mutaciones compartidas entre tumores hace que la inmunización se produzca contra neoantígenos, disminuyendo la tolerancia inmunitaria y consiguiendo frenar la aparición de nuevas clonas tumorales.

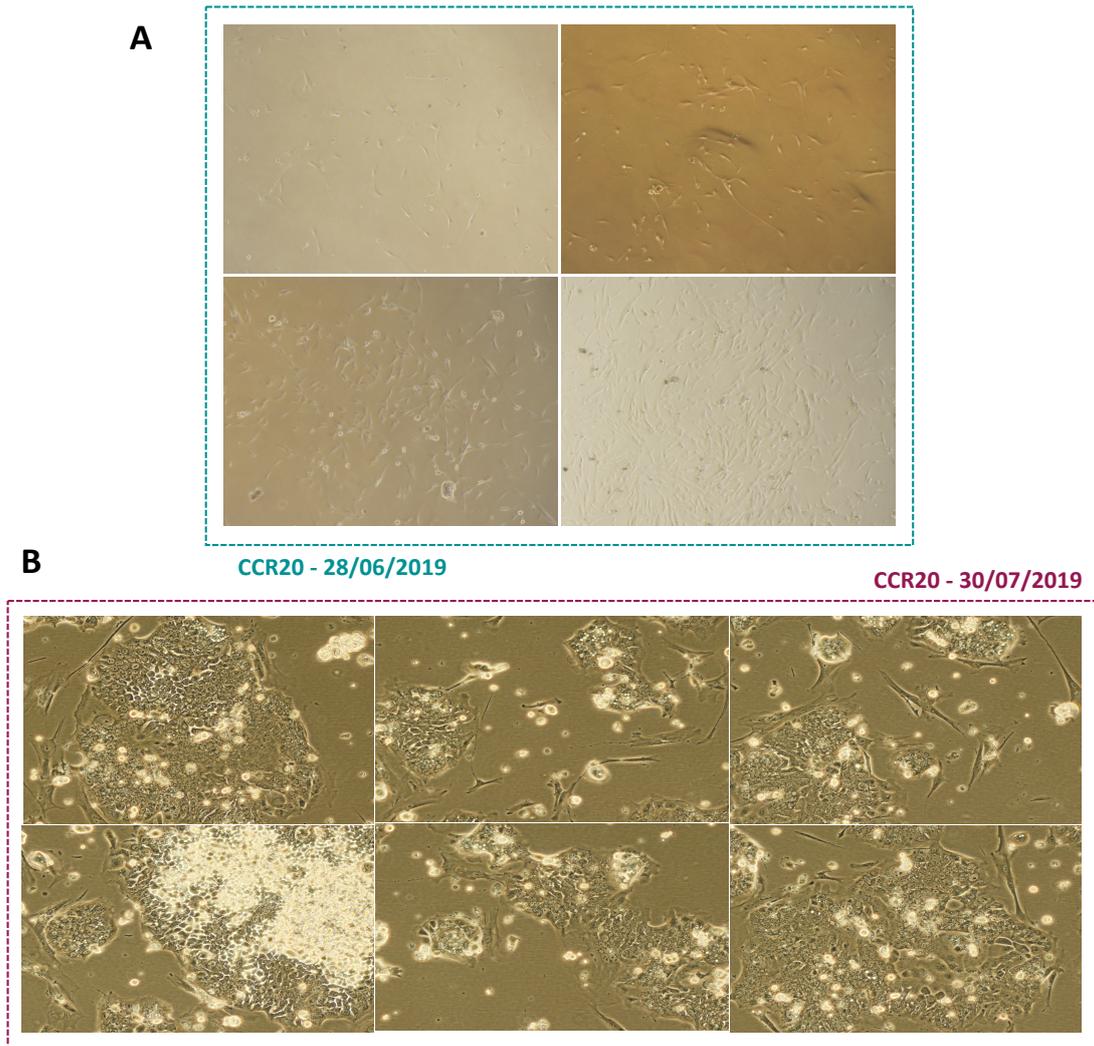


Figura R6. Evolución de las líneas celulares en cultivo. Ejemplo de la evolución de las células tumorales de un paciente (CCR20) en cultivo a lo largo de 32 días en cultivo.

Se consiguió generar líneas celulares a partir de 5 de las 42 (12%) muestras procesadas en el estudio. Las células se mantuvieron en cultivo una media de 62 días, a lo largo de los cuales se apreciaron cambios sustanciales en la apariencia de las células al observarlas en el microscopio (**figura R6**), hasta obtener un número suficiente de células para poder ser criopreservadas y posteriormente analizadas.

En cuanto a la caracterización de estas líneas tumorales, se extrajo DNA y RNA para ser analizadas mediante un panel de nanostring Oncomine 22 (que analiza mutaciones en 22 genes) y mediante la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales, respectivamente. También se realizaron tinciones de inmunohistoquímica.

De las 2 líneas analizadas mediante el panel Oncomine 22 (CCR12 y CCR13), no se encontraron mutaciones en ninguna de ellas. Esta ausencia de mutaciones hace pesar que las

líneas celulares obtenidas es poco probable que sean células tumorales, si no otras células presentes en el microambiente tumoral, aunque no podemos descartar el papel que juegan en el desarrollo del tumor.

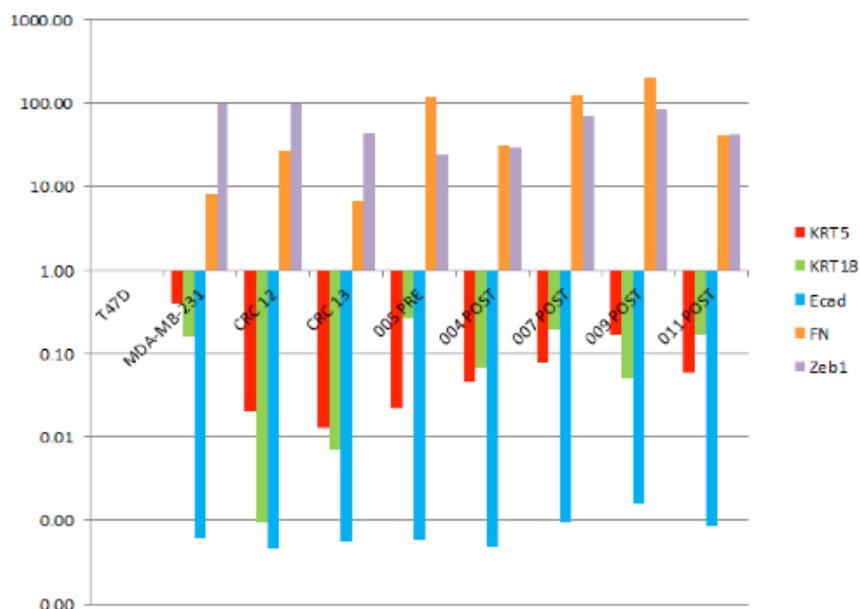


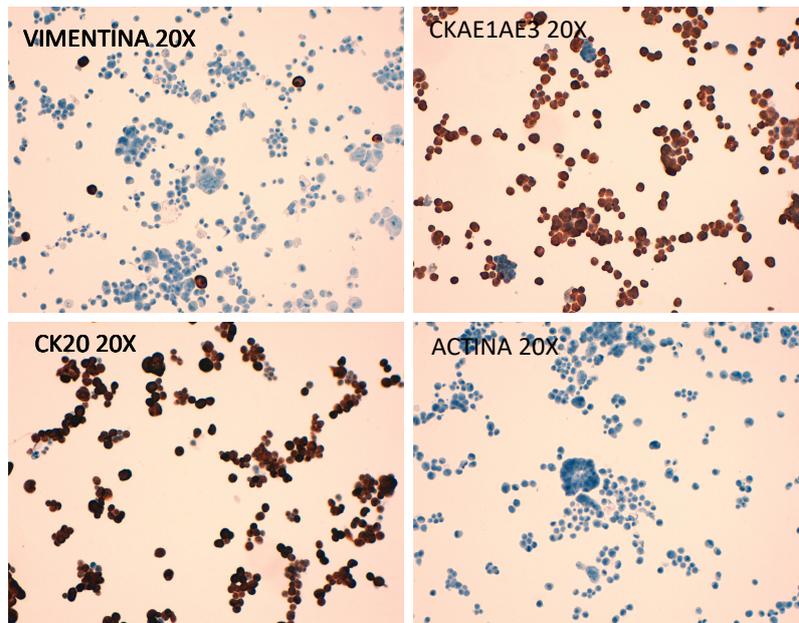
Figura R7. Análisis de la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales. Se compararon con 2 líneas de cáncer de mama con características opuestas, una fuertemente epitelial (T-47D) y otra fuertemente mesenquimal (MDAMB-231). Los marcadores epiteliales empleados son CDH1, KRT5 y KRT18 y los marcadores mesenquimales son FN y ZEB1. Se analizaron conjuntamente 7 muestras: 2 de pre-clínica (CCR12 y CCR13) y 4 de pacientes procedentes del ensayo clínico (004POST, 005PRE, 007POST, 009POST y 011POST). Todas las muestras presentaban fenotipo mesenquimal.

Por otro lado, tras el análisis de la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en 2 líneas (CCR12 y CCR13), los resultados indicaron un fuerte predominio de características mesenquimales en ambas muestras, como puede verse en la **figura R7**.

Con respecto a las tinciones anatomopatológicas, realizadas en 2 muestras (CCR19 y CCR20), se llevó a cabo el análisis de 4 marcadores tumorales: vimentina, actina, CKAE1AE3 y CK20. La vimentina es un marcador pan-mesenquimal, relacionado con mayor invasión tumoral y mal pronóstico. La actina también es un marcador mesenquimal que se expresa en diversos tipos de tumores tanto musculares como no musculares de partes blandas. CKAE1AE3 y CK20 son marcadores de citoqueratinas, que indican un fenotipo más epitelial y se expresan en diversos adenocarcinomas. Los resultados de las tinciones mediante inmunohistoquímica realizadas en 2 de las líneas tumorales disponibles mostraron fenotipos opuestos (como puede verse en la figura R8): mientras que CCR20 muestra un fenotipo muy epitelial, con una tinción

intensa de las 2 citoquinas analizadas, CCR19 muestra una tinción muy intensa para el marcador mesenquimal vimentina y algo más débil para la actina, aunque también se observa una positividad intermedia para la citoqueratina CKAE1AE3.

CCR20 (C19-09697)



CCR19 (C19-09698)

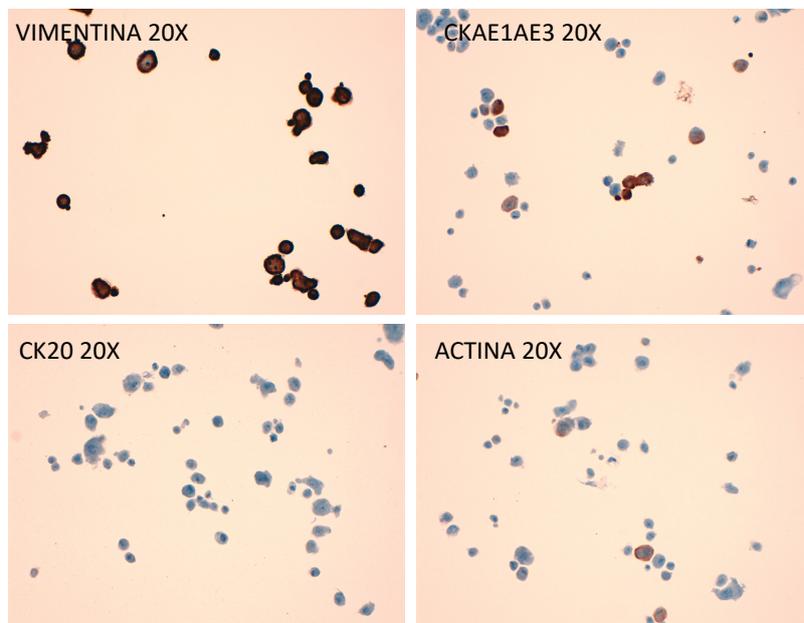


Figura R8. Tinciones de inmunohistoquímica realizadas en las líneas tumorales generadas. Los marcadores analizados fueron vimentina y actina como marcadores mesenquimales y las citoqueratinas CKAE1AE3 y CK20 como marcadores epiteliales.

1.2.2.3. Obtención de organoides

Debido a las limitaciones a la hora de conseguir generar líneas tumorales, se cambió a otra técnica para intentar generar organoides de cáncer colorrectal, unas estructuras en 3D que mantienen una estructura más similar a la propia que se encuentra en el colon (**figura R9**). Con este fin, se procesaron 6 biopsias, de las cuales se consiguieron general organoides en 1 de ellas (17%). Esta línea de investigación continúa desarrollándose por otro miembro de nuestro grupo de investigación.

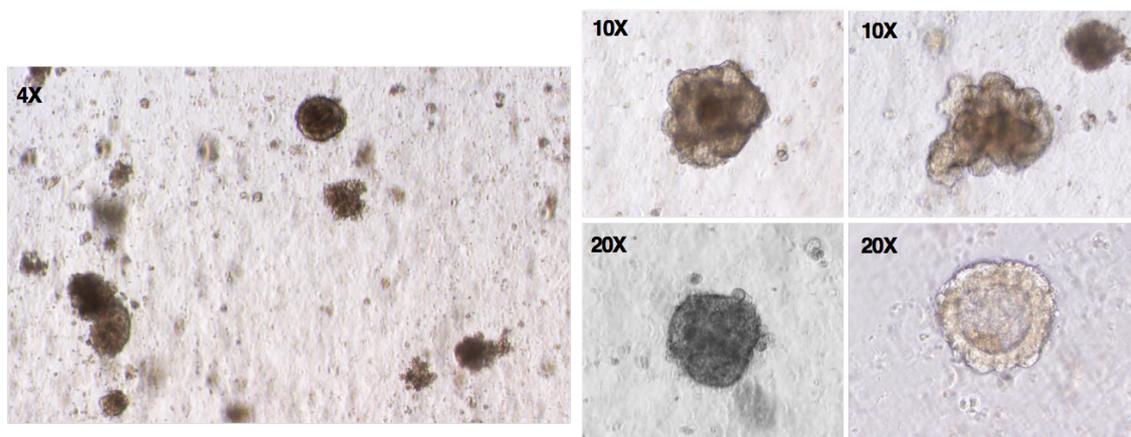


Figura R9. Organoides generados a partir de muestras de cáncer colorrectal observados al microscopio óptico.

1.2.2.4. Obtención del lisado tumoral

Se generó un lisado tumoral en las 42 biopsias obtenidas pertenecientes a los 32 pacientes del estudio. Este lisado fue empleado para sensibilizar a las DCs con antígenos tumorales autólogos y estimular así la respuesta inmunitaria de los linfocitos T de los propios pacientes en los ensayos realizados *in vitro*.

1.2.3. Sangre periférica

Para poder estudiar la capacidad de las DCs a la hora de estimular a los linfocitos T, se generaron células dendríticas maduras a partir de sangre periférica de los pacientes. De los 32 pacientes incluidos en el estudio, se generaron DCs a partir de 42 muestras de sangre periférica (22 muestras pertenecientes a pacientes previamente a recibir el tratamiento y 20 muestras pertenecientes a 10 pacientes antes y tras haber progresado al tratamiento). Los PBLs generados durante la obtención de las DCs se usaron como fuente de linfocitos T para estudiar en ellos la capacidad de ser estimulados por la combinación de DCs e inhibidores de

PD-L1-. Tanto las DCs como los PBLs, una vez obtenidas, fueron criopreservadas hasta el momento de ser utilizadas.

2. Ensayo clínico

A pesar de que con el diseño del estudio se planteaba incluir a 33 pacientes para poder detectar la eficacia del tratamiento, un análisis intermedio recomendó la terminación anticipada del estudio por no alcanzar el criterio de valoración principal y aumentar el % de la PFS de un 20 a un 40%, por lo que finalmente un total de 19 pacientes fueron tratados con la terapia combinada de ADCV y avelumab.

2.1. Características de los pacientes

El reclutamiento de los pacientes duró desde abril de 2018 hasta enero de 2019 en 9 centros hospitalarios españoles. De los 28 pacientes que realizaron el screening, 9 no fueron elegibles para entrar en el estudio (3 debido al ECOG, 4 debido a niveles elevados de LDH, 1 debido a metástasis cerebrales durante el período de screening y 1 debido a que no era posible realizar la aféresis). Así, un total de 19 pacientes con CCRm de tipo MSS (10 hombres y 9 mujeres) fueron incluidos en el estudio. Todos ellos cumplían los criterios de inclusión, firmaron el consentimiento informado, se les asignó un código en función del centro de origen y fueron tratados con la terapia combinada de ADCV y avelumab y evaluados para ver la respuesta al tratamiento.

Un análisis intermedio (primera etapa del diseño de Simon) recomendó la terminación anticipada del reclutamiento debido a que sólo 2 de los 19 pacientes tratados (11%) estaban libres de enfermedad a los 6 meses.

De los 9 centros participantes en el ensayo, finalmente 5 de ellos completaron el reclutamiento de pacientes. El centro con un mayor número de pacientes reclutado fue el Hospital Clínic de Barcelona, seguido del Instituto Valenciano de Oncología y del Hospital de Vall d'Hebron (**figura R10**).

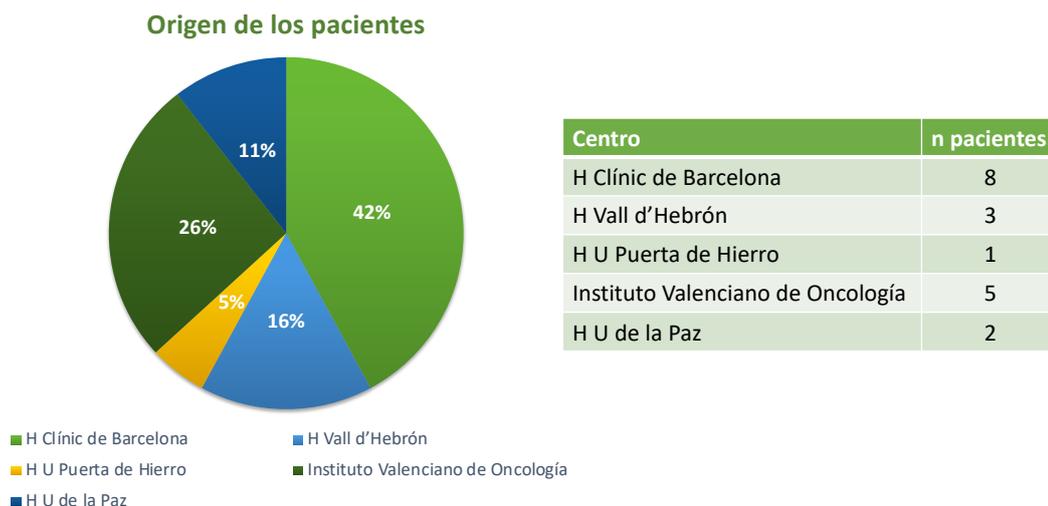


Figura R10. Origen de los pacientes del ensayo clínico. Cinco centros participaron en el reclutamiento de los 19 pacientes.

Las características demográficas de todos los pacientes incluidos en el ensayo están descritas en la **tabla R1**. Los pacientes habían recibido una mediana de 3 líneas previas de tratamiento (rango 2 – 5). Todos los pacientes habían recibido previamente irinotecán, oxaliplatín y fluoropirimidina, 14 (74%) habían recibido agentes antiangiogénicos (bevacizumab y aflibercept), 10 (53%) agentes anti-EGFR (panitumumab y cetuximab), 2 pacientes regorafenib y 2 pacientes TAS-102 (trifluridina/tipiracilo). Así mismo, el resumen de todos los datos basales genómicos y transcriptómicos de los pacientes se encuentra representado en la **tabla R2**.

Tabla R1. Características demográficas de los pacientes incluidos en el ensayo.

Variable	Total (n=19), n (%)
Mediana de edad, (rango), años	62 (32–77)
ECOG basal	
0	13 (68.4)
1	6 (31.6)
Sexo	
Masculino	10 (52.6)
Femenin	9 (47.4)
LDH basal	
<234	11 (57.9)
>234	8 (42.1)
Localización del tumor primario	
Recto	6 (31.6)
Sigma	13 (68.4)
Resección tumoral previa	
No	6 (31.6)
Sí	13 (68.4)
Número de órganos afectados	
1	4 (21.1)
2	7 (36.8)
3	5 (26.3)
4	3 (15.8)
Estadío diagnóstico histológico	
II	1 (5.3)
III	2 (10.5)
IV	16 (84.2)
Quimioterapia adyuvante	
No	17 (89.5)
Sí	2 (10.5)
Genotipo	
BRAF	1 (5.3)
KRAS	13 (68.4)
NRAS	0 (0.0)
Nativo	5 (26.3)
Líneas de tratamiento previas, número	
≤2	3 (15.8)
≤3	12 (63.2)
Metástasis hepáticas	
No	6 (31.6)
Sí	13 (68.4)
Metástasis pulmonares	
No	5 (26.3)
Sí	14 (73.7)
Metástasis ganglionares	
No	11 (57.9)
Sí	8 (42.1)
Metástasis peritoneales	
No	13 (68.4)
Sí	6 (31.6)

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group.

Tabla R2. Resumen de los datos genómicos y transcriptómicos de los pacientes del ensayo.

Paciente	RAS	BRAF	GEP	IMMETCOLS	BOR	Supervivencia (meses)
01-001	Wild-type	Wild-type	No evaluado	No evaluado	SD	DOD (19)
01-003	Wild-type	V600E	High	3	HPD	DOD (4)
01-004	Wild-type	Wild-type	Low	3	HPD	DOD (4)
01-007	Wild-type	Wild-type	High	3	PD	DOD (15)
01-008	Wild-type	Wild-type	No evaluado	No evaluado	SD	AWD (23+)
01-009	G12V	Wild-type	Low	3	PD	DOD (2018)
01-011	Wild-type	Wild-type	Low	3	SD	DOD (10)
01-012	Wild-type	Wild-type	High	1	PD	DOD (20)
02-002	G12V	Wild-type	Low	1	PD	DOD (17)
02-003	Mutado*	Wild-type	Low	3	HPD	DOD (5)
02-005	G12V	Wild-type	Low	3	PD	DOD (12)
04-001	Wild-type	Wild-type	High	3	PD	DOD (14)
05-001	G12A	Wild-type	High	3	PD	DOD (11)
05-002	Wild-type	Wild-type	Low	1	HPD	DOD (9)
05-004	G13D	Wild-type	Low	3	PD	DOD (21)
05-005	G12A	Wild-type	No evaluado	No evaluado	PD	DOD (9)
05-006	G12D	Wild-type	No evaluado	No evaluado	SD	DOD (15)
09-001	G12S	Wild-type	High	3	PD	DOD (6)
09-002	Mutado*	Wild-type	Low	3	NE	DOD (3)

*mutación no especificada. BOR, best overall response; SD, stable disease; HPD, hyperprogressive disease; PD, progressive disease; NE, no evaluable; DOD, died of disease; AWD, alive with disease.

2.2. Tratamientos administrados

2.2.1. Avelumab

Debido a que los 3 pacientes de la primera cohorte de dosis no experimentaron ninguna toxicidad limitante, todos los pacientes recibieron 10 mg/kg de avelumab cada 2 semanas hasta que la toxicidad fuera inaceptable o experimentasen progresión de su enfermedad.

2.2.2. Vacuna de células dendríticas

El tiempo mediano desde la realización de la aféresis hasta la administración de la vacuna fue de 14 días. Se analizó el fenotipo de las vacunas administradas con la caracterización de las células dendríticas mediante citometría de flujo. Por un lado, se determinó la pureza de la vacuna, con el análisis de posibles impurezas provenientes de otros tipos celulares, mediante el estudio de CD3, CD4 y CD19. Por otro lado, también se evaluó el grado de maduración de las células dendríticas de la vacuna mediante la determinación del % de expresión y el MFI de los marcadores CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7 (**figura R11**). Todos estos marcadores están implicados en la activación y capacidad migración de las células dendríticas, condicionando por tanto su capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T de manera adecuada para generar una respuesta inmune antitumoral eficaz.

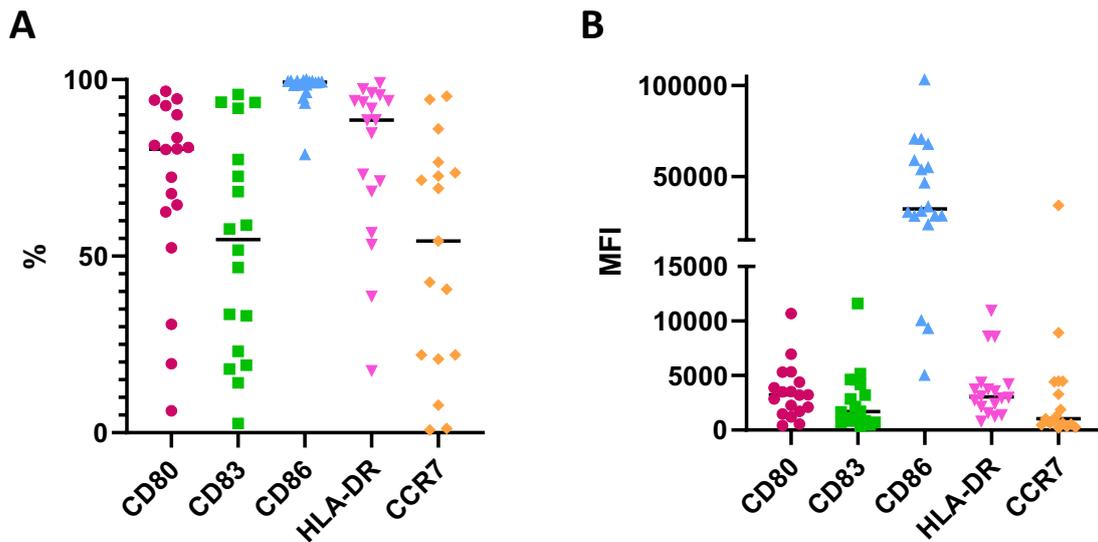


Figura R11: Fenotipo de las dendríticas de las vacunas administradas a los pacientes ensayo clínico. Se muestran los datos del % de expresión (A) y valores de MFI (B) de los distintos marcadores analizados: CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7.

Puede verse como la expresión de los diversos marcadores analizados muestran un rango muy amplio de expresión en las distintas vacunas administradas, aunque en la mayoría de los casos los marcadores de activación se expresan a altos niveles.

Tabla R3. Efectos adversos asociados con el tratamiento combinado del ensayo.

Tipo de toxicidad	Grado 1-2 (%)	Grado 3-4 (%)
Fatiga	3 (16)	1 (5)
Fiebre	3 (16)	0 (0)
Vómitos	3 (16)	1 (5)
Anorexia	3 (16)	0 (0)
Diarrea	2 (10)	1 (5)
Artralgia	2 (10)	0 (0)
Prurito	2 (10)	0 (0)
Rash	1 (5)	0 (0)
Síntomas de gripe	1 (5)	0 (0)
Anemia	1 (5)	0 (0)
Incremento de AST	1 (5)	0 (0)
Incremento de ALT	1 (5)	0 (0)
Hipotiroidismo	1 (5)	0 (0)
Estomatitis	1 (5)	0 (0)
Mialgia	1 (5)	0 (0)
Pneumonitis	1 (5)	0 (0)

AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa

En cuanto a la seguridad del tratamiento, no se observaron efectos adversos graves. Los efectos adversos más frecuentes fueron fatiga, diarrea y síntomas de gripe. Por lo general ambas terapias fueron bien toleradas, con tan solo un 5% de toxicidades de grado 3-4 (fatiga, vómitos y diarrea). Estos datos confirman la seguridad de este tipo de terapias, ya observados ampliamente en el caso de las células dendríticas, y aportan nuevos datos en el caso del avelumab, del cual se tiene menos experiencia en este tipo de pacientes. La incidencia de los diferentes tipos de toxicidades está resumida en la **tabla R3**.

2.3. Evaluación de la eficacia clínica de la terapia combinada

El seguimiento de los pacientes incluidos en el ensayo fue llevado a cabo en el servicio de Oncología del Hospital Clínic de Barcelona, así como en los demás centros participantes en el estudio, por parte de los oncólogos adscritos al proyecto.

Para valorar la eficacia clínica del tratamiento, se realizaron TACs toracoabdominales a todos los pacientes incluidos, en el momento basal y en los seguimientos correspondientes cada 8 semanas. Dichos estudios se realizaron en el “Centre de Diagnòstic per la Imatge” (CDI) del Hospital Clínic de Barcelona, así como en los demás centros participantes, por parte de los radiólogos adscritos al proyecto.

Además, todos los pacientes incluidos en el ensayo fueron sometidos a analíticas periódicas para valorar tanto la toxicidad, como la respuesta clínica al tratamiento.

2.3.1. Supervivencia libre de progresión

Todos los pacientes, excepto uno (que experimentó un rápido empeoramiento clínico), fueron valorables para la evaluación de la respuesta al tratamiento. En la siguiente tala se puede observar los resultados obtenidos tras la evaluación según los criterios RECIST 1.1 de respuesta al tratamiento (**tabla R4**).

Tabla R4. Respuesta clínica de los pacientes evaluada por criterios RECIST 1.1.

ID paciente	Respuesta global	Fecha inicio tratamiento	Fecha fin de tratamiento	Fecha progresión	PFS (días)
01-001	SD	29/03/202018	07/11/202018	17/08/202018	130
01-003	HPD	27/04/202018	04/08/202018	06/08/202018	89
01-004	HPD	29/05/202018	02/08/202018	17/08/202018	91
01-007	PD	03/09/202018	04/10/202018	03/11/202018	94
01-008	SD	27/07/202018	05/09/2019	31/01/2019	160
01-009	PD	12/09/202018	31/01/2019	29/11/202018	93
01-011	SD	23/10/202018	20/02/2019	22/02/2019	136
01-012	PD	21/09/202018	17/01/2019	25/01/2019	126
02-002	PD	24/10/202018	15/12/202018	14/02/202018	71
02-003	HPD	09/11/202018	05/01/2019	08/01/2019	89
02-005	PD	21/01/2019	16/03/2016	25/03/2019	74
04-001	PD	06/09/202018	10/11/202018	14/11/202018	76
05-001	PD	02/10/202018	17/01/2019	15/01/2019	134
05-002	HPD	10/10/202018	05/12/202018	29/11/202018	79
05-004	PD	07/11/202018	14/02/2019	2018/02/2019	152
05-005	SD	31/10/202018	21/03/2021	19/02/2019	147
05-006	PD	28/11/202018	27/12/202018	09/01/2019	63
09-001	PD	20/09/202018	16/11/202018	22/11/202018	86
09-002	NE	31/01/2019	15/02/2019	27/03/2019	97

SD, stable disease; HPD, hyperprogressive disease; PD, progressive disease; NE, no evaluable; PFS, progression free survival.

No se observaron respuestas objetivas al tratamiento. Uno de los pacientes alcanzó una enfermedad estable inicial, durante 160 días (con una supervivencia global de más de 696 días, continúa vivo). De los 18 pacientes evaluables, 4 (22.2%) presentaron enfermedad estable, 10 (55,55%) mostraron progresión de la enfermedad y 4 (22.2%) experimentaron hiperprogresión de la enfermedad (**figura R12**).

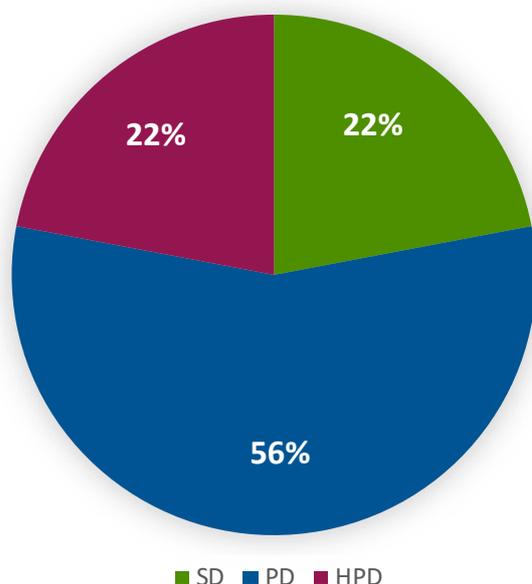


Figura R12. Respuesta clínica de los pacientes incluidos en el ensayo. SD, stable disease; PD, progressive disease; HPD, hyperprogressive disease.

Con respecto a la evolución clínica de los pacientes, en la **figura R13** pueden verse pruebas de imagen de 5 pacientes realizadas básalmente y a los 2 meses de haber recibido el tratamiento. En el paciente 01-004, que experimentó una hiperprogresión de su enfermedad,

puede apreciarse el gran aumento de las metástasis a nivel hepático. En la figura también pueden verse otros ejemplos de la evolución de las lesiones de pacientes que experimentaron progresión de la enfermedad y un paciente que experimentó enfermedad estable.

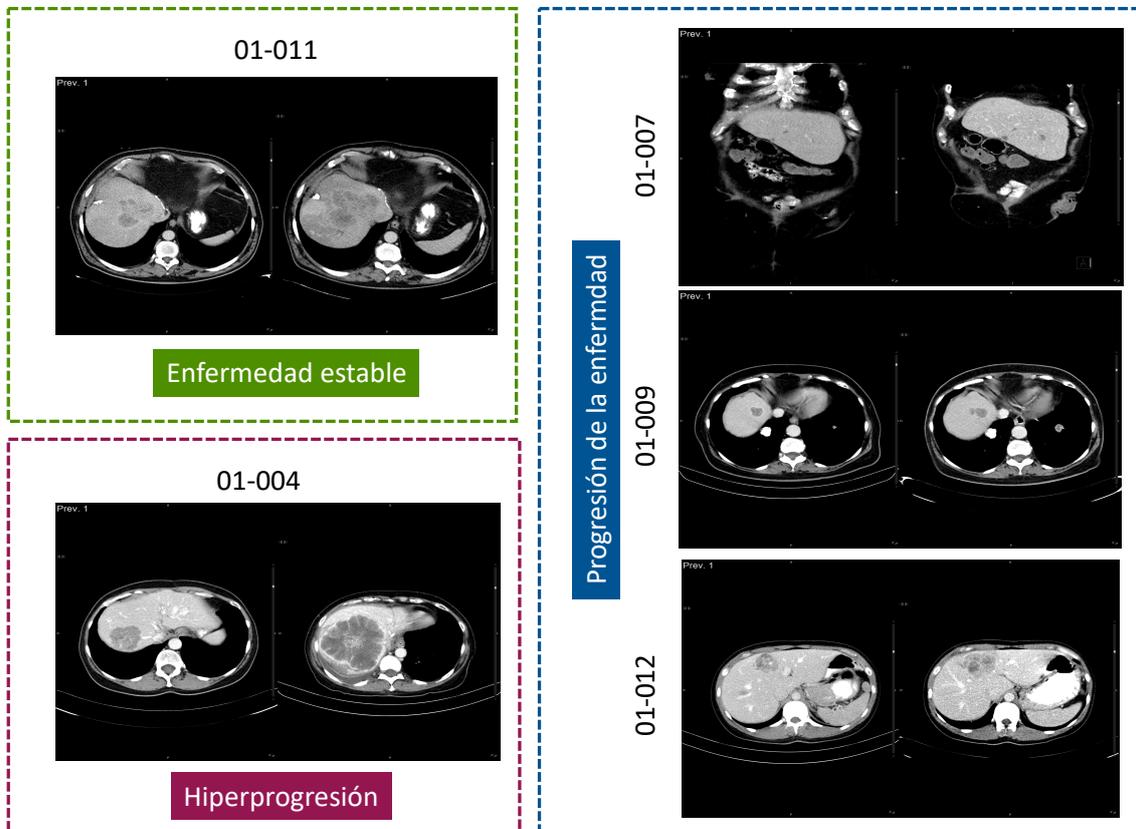


Figura R13. Imágenes radiológicas que muestran el curso clínico de los pacientes. Ejemplos de 5 pacientes (1 enfermedad estable, 1 hiperprogresión y 3 progresión de la enfermedad). Imágenes de CT (tomografía computarizada) basales y 2 meses post-tratamiento.

El tiempo medio hasta la progresión de la enfermedad (PFS, *progression free survival*) fue de 105 días (mediana 93 días), con un rango de 63 – 160 días (**figura R14**).

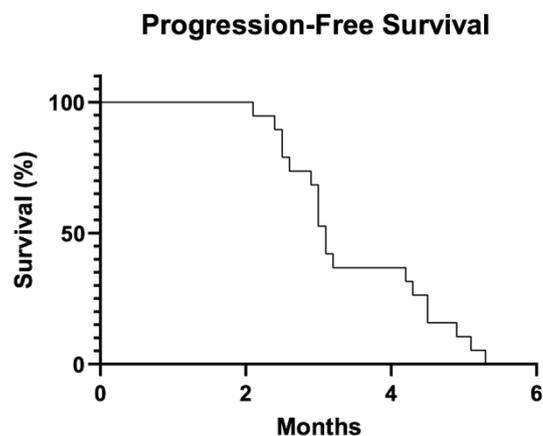


Figura R14. Supervivencia libre de progresión de los pacientes incluidos en el ensayo.

2.3.2. Supervivencia global

A pesar de no haber alcanzado la variable principal del estudio, en cuanto a supervivencia libre de progresión en función de los criterios RECIST 1.1, cada vez es más evidente de que éste no es un criterio adecuado para valorar la respuesta al tratamiento con inmunoterapia, ya que la inmunoterapia, a diferencia de la quimioterapia o terapias dirigidas, necesita una valoración clínica de su eficacia a más largo plazo. Una alternativa para realizar una valoración más adecuada sería la supervivencia global. Para ello, se realizó un seguimiento mínimo de 6 meses desde la fecha de inclusión del último paciente, censurando los pacientes que aún seguían vivos a fecha 20/07/2020 (**tabla R5**).

Tabla R5. Supervivencia global

ID paciente	Fecha de inclusión	Fecha de exitus	Días OS
01-001	09/04/2018	13/11/2019	583,00
01-003	09/05/2018	11/09/2018	125,00
01-004	18/05/2018	23/09/2018	128,00
01-007	01/08/2018	22/11/2019	478,00
01-008	24/08/2018	-	696,00
01-009	28/08/2018	20/02/2020	541,00
01-011	09/10/2018	11/08/2019	306,00
01-012	21/09/2018	28/05/2020	615,00
02-002	04/10/2018	05/03/2020	518,00
02-003	11/10/2018	14/03/2019	154,00
02-005	10/01/2019	12/01/2020	367,00
04-001	30/08/2018	19/10/2019	415,00
05-001	03/09/2018	30/08/2019	361,00
05-002	11/09/2018	01/06/2019	263,00
05-004	19/09/2018	13/06/2020	633,00
05-005	25/09/2018	01/06/2019	249,00
05-006	07/11/2018	26/02/2020	476,00
09-001	28/08/2018	04/02/2019	160,00
09-002	20/12/2018	27/03/2019	97,00

OS, *overall survival*.

La supervivencia media global fue de 377 días (mediana 367 días), con un rango de 97 – 696 días (**figura R15**).

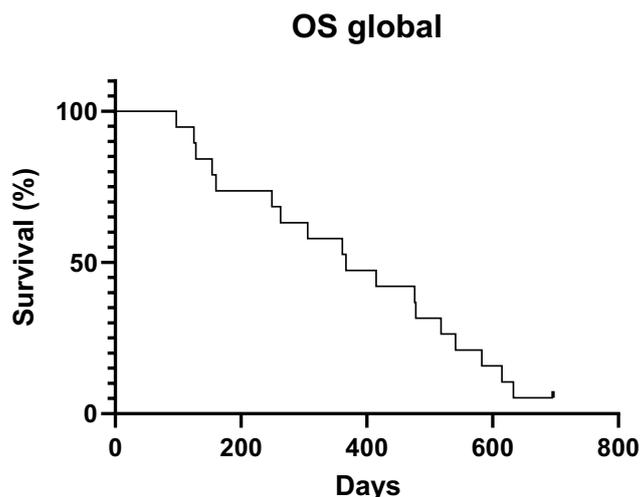


Figura R15. Supervivencia global

Trece pacientes recibieron líneas adicionales de tratamiento tras haber abandonado el estudio debido a la progresión de la enfermedad. Finalmente, 18 pacientes fallecieron debido a la progresión tumoral.

A pesar de no haber alcanzado el objetivo de incrementar un 40% la PFS a los 6 meses, al analizar de forma global los datos obtenidos en el seguimiento clínico, podemos observar que la supervivencia global (media de >12 meses) es superior a la documentada en este tipo de pacientes (habitualmente de unos 6 meses), con lo que parece que esta terapia puede incrementar la supervivencia para estos pacientes que por lo general tienen muy mal pronóstico.

2.4. Monitorización de la respuesta inmunitaria

Uno de los principales objetivos de este trabajo era la monitorización en profundidad de la respuesta inmunitaria de los pacientes incluidos en el ensayo, comparando su situación pre- y post-tratamiento, para así poder evaluar la respuesta inmunitaria al tratamiento y comprobar si la combinación de células dendríticas cargadas con un lisado tumoral autólogo con un inhibidor de la vía PD-L1 eran eficaces a la hora de generar una respuesta inmune específica antitumoral.

Para llevar a cabo una evaluación de la mencionada respuesta inmunitaria antitumoral, se obtuvieron muestras de los pacientes previas al inicio del tratamiento (muestras PRE) y muestras tras haber recibido 5 dosis de la vacuna, en el día 56 de tratamiento (muestras POST). En dichas muestras se estudió la generación y expansión de linfocitos T antitumorales (mediante ensayos de proliferación), el fenotipo de dichos linfocitos T (en función de las

citocinas producidas en respuesta al lisado tumoral) y también se estudiaron diferentes niveles de citocinas y de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.

2.4.1. Generación de TILs y líneas tumorales

A pesar de haber sido incluidos 19 pacientes en el estudio, no se dispuso de muestras frescas de biopsias tumorales PRE y POST en todos ellos para poder generar a partir de las mismas TILs y líneas tumorales. Las biopsias se enviaban congeladas en aquellos pacientes procedentes de centros diferentes al Hospital Clínic de Barcelona, por lo que no se pudieron obtener células viables para el aislamiento y cultivo de linfocitos T y de células tumorales.

Del total de los 19 pacientes incluidos y tratados en el ensayo, obtuvimos biopsias en 10 de ellos. En 9 pacientes se obtuvo biopsia PRE y POST tratamiento, mientras que en 1 pacientes sólo biopsias PRE tratamiento, haciendo un total de 19 biopsias frescas procesadas.

Otro de los obstáculos que nos encontramos a la hora de generar TILs y líneas tumorales, fue el tamaño limitado de las biopsias que nos encontramos en muchos casos. De las 19 biopsias procesadas, 13 (68%) proveían del tumor primario de la región colorrectal, extraídas mediante colonoscopia, mientras que 4 (21%) fueron obtenidas de metástasis accesibles hepáticas y 2 (11%) pulmonares. En estas dos últimas situaciones, las biopsias eran extraídas mediante punción dirigida por ecografía (metástasis hepáticas) o por TAC (metástasis pulmonares), obteniéndose cilindros de tamaño más limitado en comparación con las muestras obtenidas por endoscopia. Puesto que la prioridad del ensayo era tratar a los pacientes, la mayoría del material tumoral fue destinado a la preparación del lisado tumoral para la vacuna de células dendríticas y al diagnóstico de anatomía patológica, destinando una mínima parte de la misma para el cultivo celular (**figura R16**).

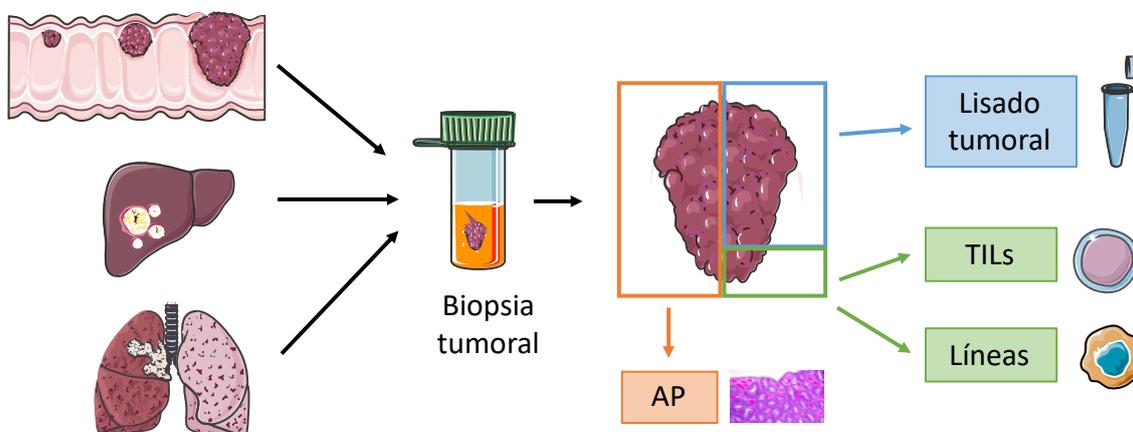


Figura R16. Distribución del material tumoral procedente de las biopsias. La mitad del material obtenido fue destinado al diagnóstico anatómico patológico y de la otra mitad restante, 3 cuartos se

destinaron a la preparación del lisado tumoral empleado en la vacuna y un cuarto a la generación de TILs y líneas tumorales. TILs, *tumor infiltrating lymphocytes*; AP, anatomía patológica.

Pese a todas estas limitaciones, a partir de las 19 biopsias frescas conseguimos obtener TILs en 2 de ellas (11%), en ambos casos se trataban de biopsias de tumor primario post-tratamiento. En cuanto a líneas tumorales, se obtuvieron en 8 de ellas (42%): 4 a partir de biopsias pre-tratamiento y 4 a partir de biopsias post-tratamiento; de estas 8 biopsias, 3 proveían de metástasis hepáticas y 5 de tumor primario.

En lo referente a las 8 líneas tumorales generadas, que se obtuvieron tras una media de 80 días en cultivo (49 – 124 días), se caracterizaron mediante 3 métodos. Por un lado, se extrajo DNA de 4 líneas y se analizaron mutaciones en un panel de 22 genes (Oncomine 22) mediante la tecnología de nanoString y por otro, se extrajo también RNA para analizar la expresión de distintos marcadores epiteliales y mesenquimales en 4 de las líneas (los resultados de este análisis pueden verse en la **figura R7**, ya que se analizaron de manera conjunta con líneas tumorales procedentes de muestras del estudio pre-clínico). En cuanto al panel de Oncomine 22, de los genes analizados (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11 y TP53), en 1 de las muestras se encontraron mutaciones en PTEN, KRAS y SMAD4 (con una frecuencia de alelo mutado del 33 al 50%), mientras que en las otras 3 muestras no se identificaron ninguna de las mutaciones incluidas en el panel (**tabla R6**).

Tabla R6. Resultados panel Oncomine 22.

ID	% células tumorales	Mutaciones
GC01/004	No detectado	No detectado
GC01/007	No detectado	No detectado
GC01/009	40%	<ul style="list-style-type: none"> • PTEN: c.850G>T; p.(Glu284Ter); frecuencia aproximada alelo mutado 33% • KRAS: c.35G>T; p.(Gly12Val); frecuencia aproximada alelo mutado 40% • SMAD4: c.1081C>T; p.(Arg361Cys); frecuencia aproximada alelo mutado 50%
GC01/011	No detectado	No detectado

Los 22 genes analizados son: AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SAMD4, STK11, TP53.

También se realizó una caracterización de una de las líneas tumorales obtenidas mediante tinciones en de inmunohistoquímica (**figura R17**).

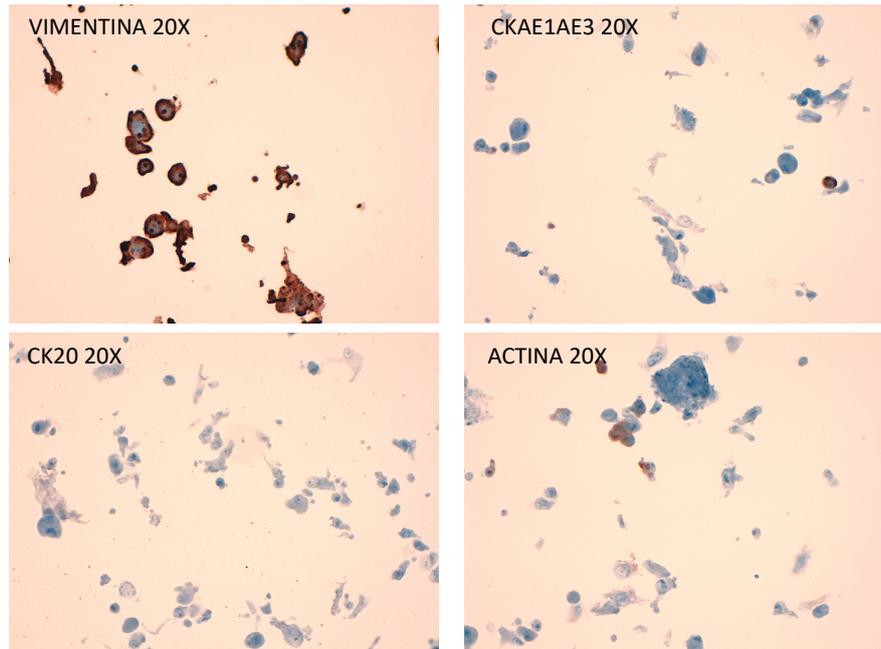


Figura R17. Tinciones de inmunohistoquímica realizadas en las líneas tumorales generadas. GC01/007 POST. Los marcadores analizados fueron vimentina y actina como marcadores mesenquimales y las citoqueratinas CKAE1AE3 y CK20 como marcadores epiteliales.

2.4.2. Citocinas

El cáncer colorrectal metastásico es uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial y sin embargo tiene una baja tasa de supervivencia, siendo una de las principales causas de muerte relacionadas con cáncer (342,343). A pesar de la aparición de nuevas terapias, como vacunas o inhibidores de punto de control, éstas siguen siendo ineficaces en algunos grupos de tumores. Debido a estas limitaciones, uno de los objetivos importantes de ese trabajo era encontrar biomarcadores de respuesta a estas terapias, para poder seleccionar mejor e identificar posteriormente el grupo de pacientes que puedan beneficiarse de este tratamiento.

Para abordar dicho objetivo, se utilizó un panel de 16 citocinas que incluía SDF1a (CXCL12), IL-2, IL-6, IL-10, IL-17a, IL-23, IFNg, MCP1, (CCL2), FasL (CD95L), MMP-9, RANTES (CCL5), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, TGFb1 y TGFb3. Se determinó mediante Luminex y ELISA su concentración en las muestras de suero obtenidas de los pacientes a día 0 (en el momento basal) y 56 (tras haber recibido la quinta vacuna) de tratamiento. De este modo, las muestras de 16 pacientes en los cuales se disponía de muestras PRE y POST tratamiento, se analizaron simultáneamente (para evitar variaciones inter-ensayo) para comprobar si existía alguna variación en los niveles de alguna citocina que se pudiera asociar al afecto del tratamiento ejercido sobre el sistema inmunitario.

En la **figura R18** pueden verse las variaciones, tanto individuales como globales, de las citocinas en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En la **figura R19** pueden verse las variaciones, tanto individuales como globales, de las citocinas en las que se encontraron diferencias no significativas.

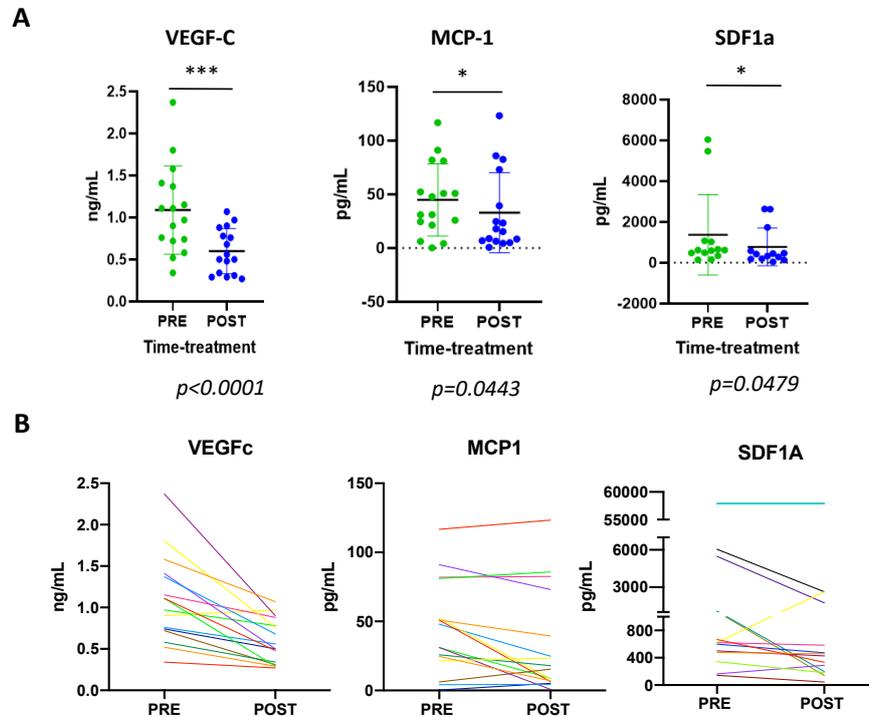


Figura R18. Análisis global (A) e individual (B) de la expresión de citocinas en suero de pacientes que variaron sus niveles de forma significativa.

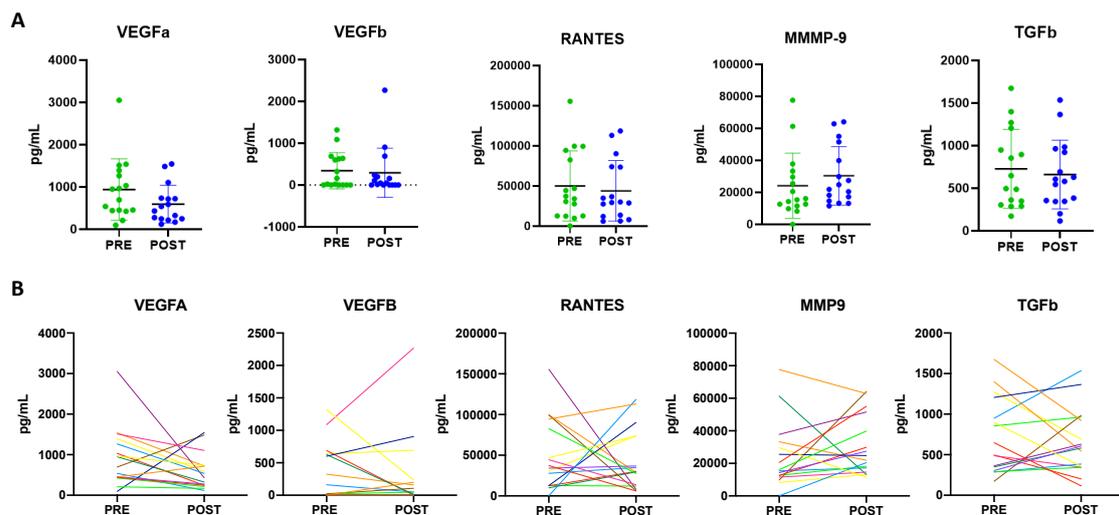


Figura R19. Análisis global (A) e individual (B) de la expresión de citocinas en suero de pacientes que variaron sus niveles de forma no significativa.

Como puede observarse en los gráficos anteriormente mencionados, los niveles de citocinas y quimiocinas asociadas a progresión tumoral, linfoangiogénesis y metástasis,

como MCP-1, VEGFC, TGFb, VEGFA o VEGFB, disminuyeron sus niveles tras el tratamiento, sugiriendo que la terapia ejerció un efecto estimulante sobre el sistema inmune; mientras que MMP-9, una proteasa asociada a peor pronóstico en cáncer, aumenta sus niveles tras el tratamiento, aunque no de manera significativa ($p=0.1928$). Sorprendentemente, SDF1a, una quimiocina inducida por estímulos proinflamatorios, mostró un descenso en su concentración post-tratamiento ($p=0.0479$), así como en el caso de la quimiocina RANTES (aunque muy sutilmente, $p=0.8999$).

No se detectaron niveles en suero de las citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-17a, IL-23, FasL o IFNg, ya fuera en muestras obtenidas antes o después de haber recibido la terapia.

Si bien es cierto que los cambios observados en los niveles séricos de las citocinas estudiadas son sutiles, haciendo difícil afirmar que el tratamiento está ejerciendo un efecto estimulante sobre la actividad anti-tumoral del sistema inmune, es difícil detectar efectos claros al tratarse de un análisis de muestras en la periferia (y no en el ambiente local del propio tumor) así como el número limitado de pacientes estudiados.

Para poder visualizar de manera más clara los cambios en los niveles de citocinas tras el tratamiento, se analizaron las 8 citocinas que mostraron mayores niveles en suero (SDF1a, MCP-1, MMP-9, RANTES, VEGFB, VEGFA, VEGFC y TGFb), así como el porcentaje de variación de cada una de ellas tras el tratamiento (**figura R20**). Se aprecia una gran variabilidad de los pacientes en los valores de las distintas citocinas, así como en los cambios en las concentraciones de las mismas. Las citocinas que más varían sus niveles tras el tratamiento son MMP-9, VEGFB, y MCP-1, mientras que aquellas que lo hacen en un mayor número de pacientes son VEGFa, TGFb, MCP-1, MMP-9 y RANTES. VEGFa, VEGFc, MCP-1 y TGFb disminuyen en la mayoría de pacientes y MMP-9 y RANTES aumentan en un mayor número de pacientes.

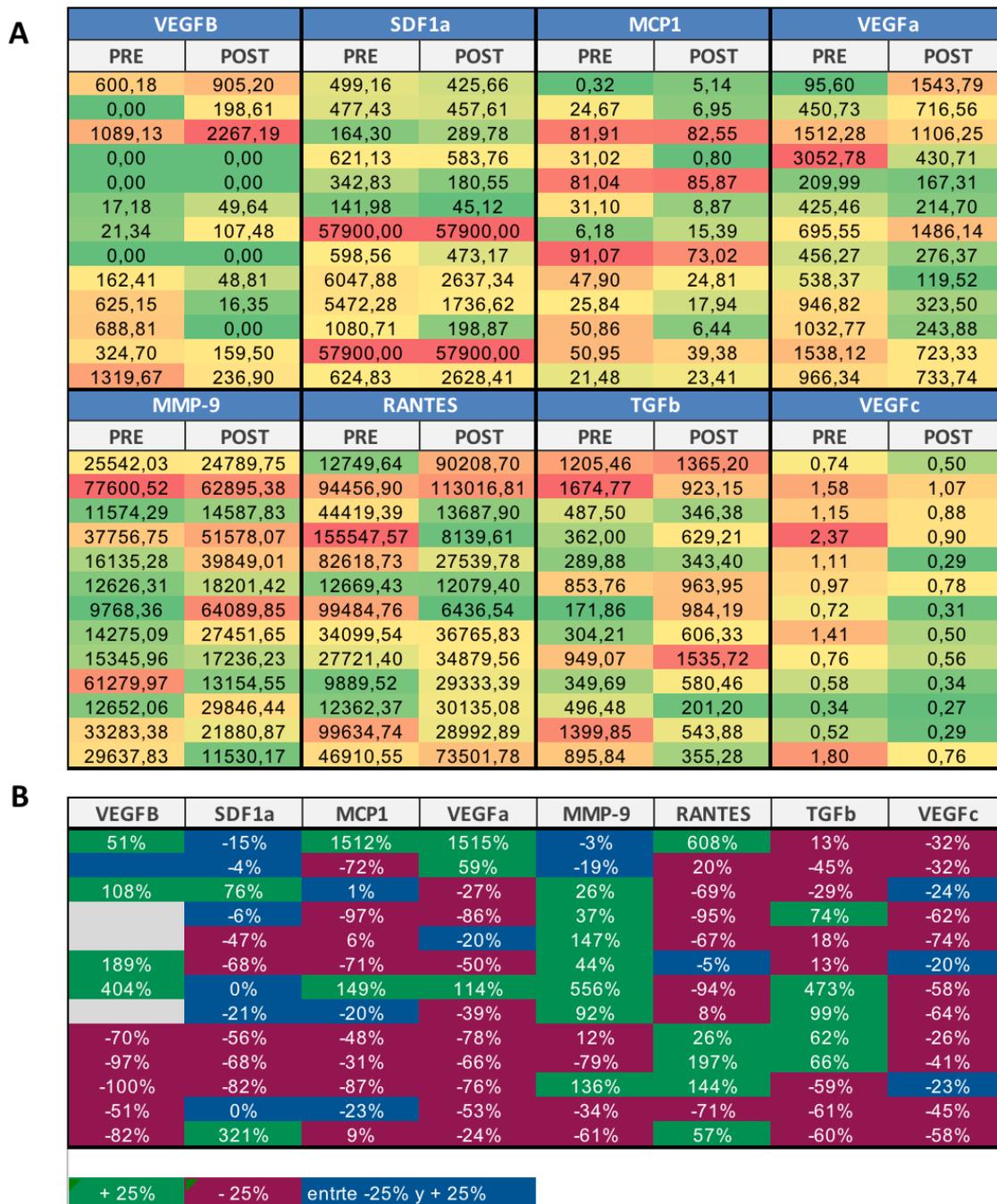


Figura R20. Variaciones de los niveles de citocinas. Muestras pre y post tratamiento en números absolutos (A) y en % de aumento de la muestra post-tratamiento con respecto a la muestra pre-tratamiento (B).

2.4.2. Proliferaciones linfocitarias

El tratamiento administrado a los pacientes tiene como finalidad activar al sistema inmune de forma específica frente al tumor (por parte de las células dendríticas cargadas con los péptidos tumorales autólogos) y frenar los mecanismos de inhibición expresados en el

microambiente tumoral (por parte del inhibidor de PD-L1) para conseguir, conjuntamente, superar los mecanismos inmunosupresores y eliminar a las células tumorales.

Para detectar la capacidad de activación del sistema inmune ejercida por la terapia combinada, se determinó la capacidad de generar la activación y proliferación de los linfocitos T mediante ensayos de proliferación con timidina tritiada (los linfocitos T incorporan la timidina tritiada del medio extracelular cuando proliferan).

Puesto que en los ensayos de proliferación empleamos células dendríticas autólogas cargadas con antígenos tumorales autólogos, las diferencias de activación detectadas pre y post tratamiento serán debidas a una activación específica del sistema inmune frente al tumor propio.

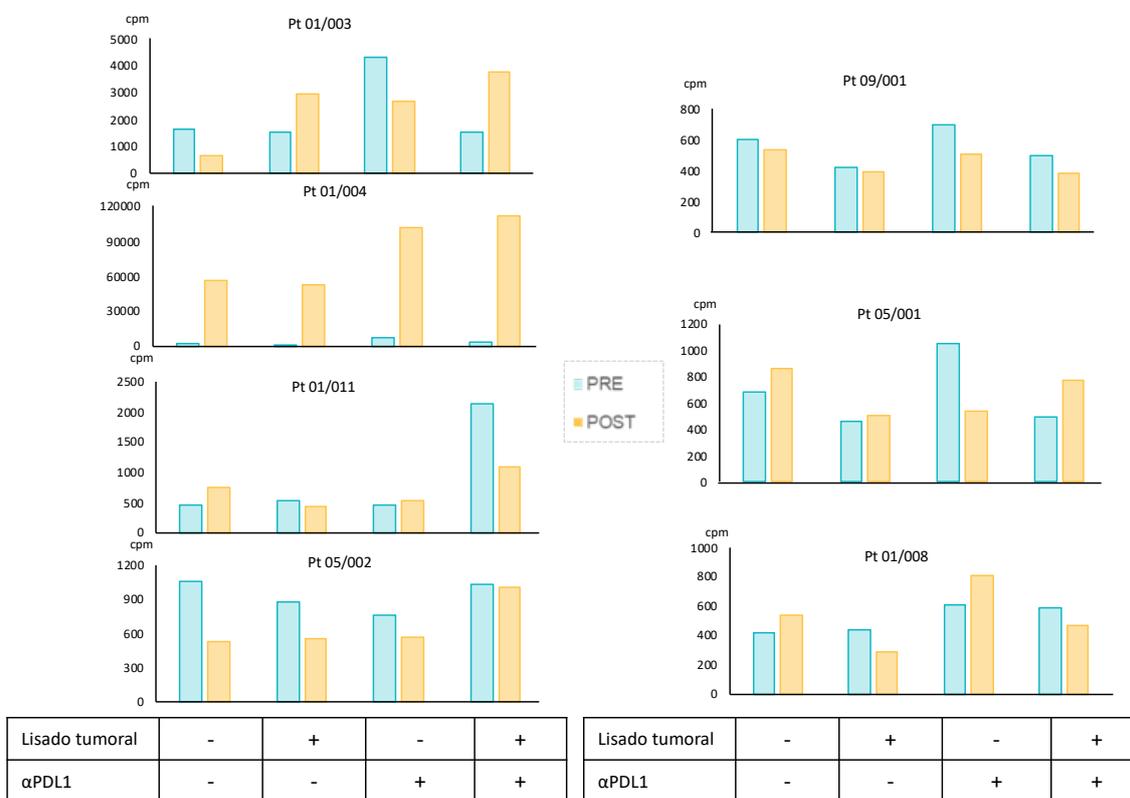


Figura R21. Análisis individual de las proliferaciones linfocitarias. Muestras pre tratamiento (en azul) y post tratamiento (en amarillo), en cada una de las 4 condiciones de cultivo: DCs sin lisado tumoral ni anti-PD-L1 (control negativo); DCs con lisado tumoral sin anti-PD-L1 (efecto de la vacuna); DCs sin lisado tumoral con anti-PD-L1 (efecto del avelumab); DCs con lisado tumoral y con anti-PD-L1 (efecto de la terapia combinada). Cpm, cuentas por minuto; αPDL1, anti- PD-L1; PRE, muestras pre-tratamiento; POST, muestras a los 56 días del tratamiento.

Para llevar a cabo esta evaluación, se analizaron las muestras de PBMCs y DCs pertenecientes a 7 pacientes, obtenidas antes y tras 56 días de haber comenzado el tratamiento.

Los resultados de los pacientes individuales pueden verse en la **figura R21**. En 4 de los 7 pacientes estudiados (57%) se observa un efecto mayor en el caso de la combinación de células dendríticas con lisado tumoral y anti-PDL1. Sin embargo, sólo observamos que la proliferación de los linfocitos fuese mayor tras haber recibido el tratamiento en 3 de los 7 pacientes analizados (43%).

Para poder analizar todos los pacientes en conjunto, se calculó la ratio de proliferación: la proliferación en cada una de las condiciones con respecto al control negativo (DCs sin lisado tumoral y sin anti-PDL1). En este análisis se observa un leve efecto sinérgico de la terapia combinada con respecto a cada una de las terapias individuales (**figura R22**).

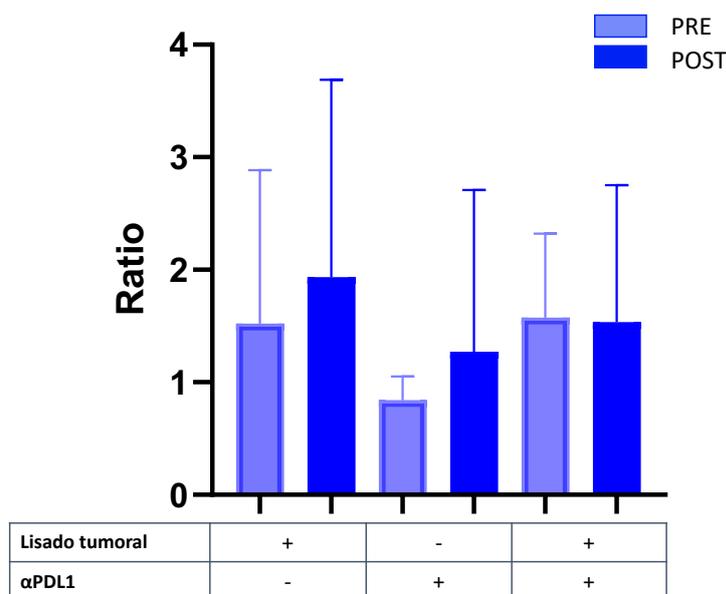


Figura R22. Análisis global de la proliferación de linfocitos T en co-cultivo con células dendríticas (DCs). Cálculo de la ratio de proliferación: la proliferación de cada una de las condiciones con respecto al control negativo (DCs sin lisado tumoral y sin anti-PDL1). De esta manera es posible analizar todos los pacientes en conjunto y se observa un leve efecto sinérgico en la terapia combinada, así como un mayor efecto post-tratamiento. Cpm, cuentas por minuto; α PDL1, anti-PD-L1; PRE, muestras pre-tratamiento; POST, muestras a los 56 días del tratamiento.

También se analizó el sobrenadante de estos co-cultivos, en los cuales se determinó la concentración de la citocina pro-inflamatoria IFN γ y de la anti-inflamatoria IL-10 (**figura R23**). Los niveles de producción de IFN γ se incrementaron tras recibir el tratamiento. Aunque se

detecta producción de IL-10, los niveles son muy bajos (en todos los pacientes están por debajo de los 10 pg/mL, tan sólo ay un paciente con una concentración más elevada, en la cual también observamos unos niveles muy elevados de IFN γ y de proliferación linfocitaria).

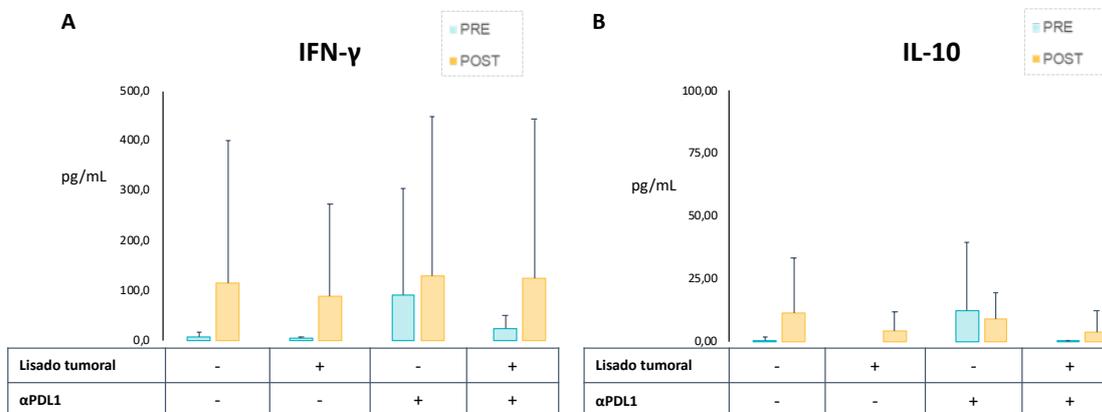


Figura R23. Producción de citocinas en el sobrenadante de los cultivos de las proliferaciones linfocitarias. α PDL1, anti- PD-L1; PRE, muestras pre-tratamiento; POST, muestras a los 56 días del tratamiento.

2.4.3. Subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)

Otro de los abordajes para encontrar biomarcadores de respuesta al tratamiento fue el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.

Para detectar signos de un incremento en la actividad del sistema inmune, se analizaron diferentes subpoblaciones linfocitarias en 11 pacientes en los cuales se disponía de muestras de sangre periférica pre y post tratamiento. Se evaluaron las proporciones de células *naïve* (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO-), *effector* (CD62L-CCR7-CD45RA+CD45RO-), *stem memory* (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO+), *central memory* (CD62L+CCR7+CD45RA-CD45RO+), *effector memory* (CD62L-CCR7-CD45RA-CD45RO+) T reguladoras (CD4+CD25++CD127low), así como la expresión de PD-1 y CTLA-4 en linfocitos CD4 y CD8.

Como puede verse en la **figura R24**, no se encontraron variaciones significativas en los niveles de las diferentes subpoblaciones linfocitarias analizados comparando las situaciones pre y post tratamiento.

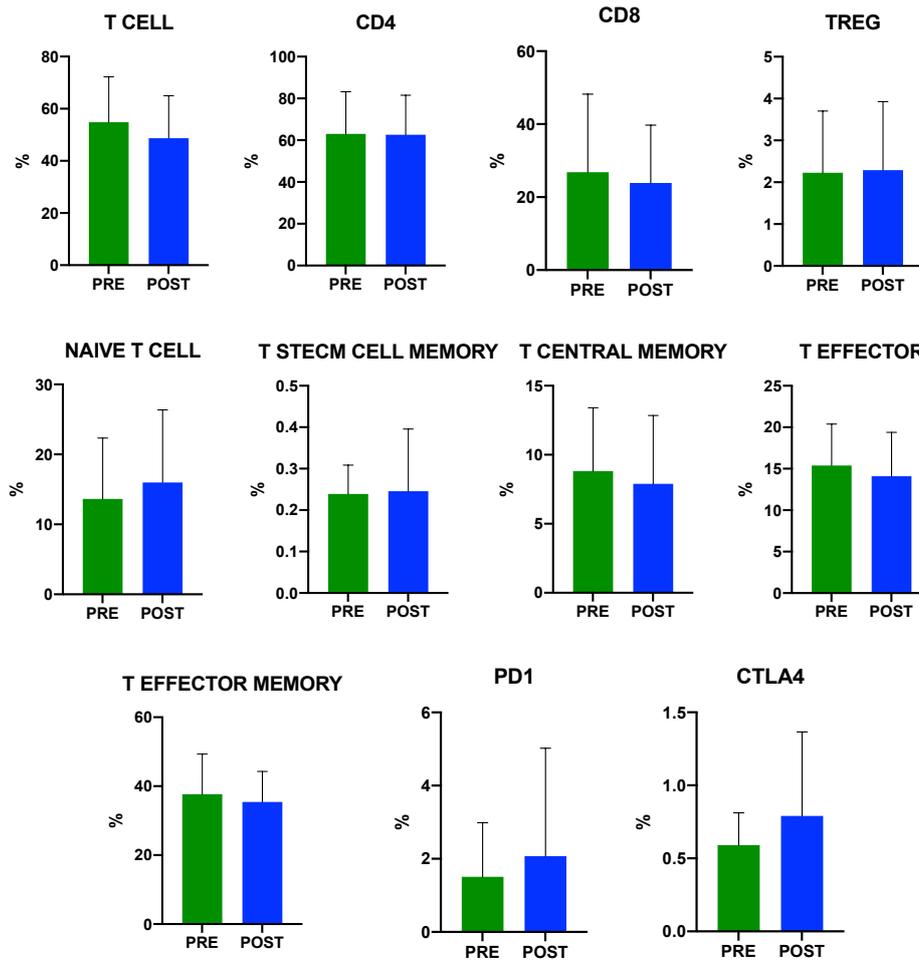


Figura R24. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (PBMCs) de muestras pre y post tratamiento. NAIVE T CELL (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO-); T EFFECTOR (CD62L-CCR7-CD45RA+CD45RO-); T EFFECTOR MEMORY (CD62L-CCR7-CD45RA-CD45RO+); T STEMCELL MEMORY (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO+); T CENTRAL MEMORY (CD62L+CCR7+CD45RA-CD45RO+); T REGULATORY (CD4+CD25++CD127low). PRE, muestras pre-tratamiento; POST, muestras a los 56 días del tratamiento.

También podemos observar la gran variabilidad individual detectada en las diversas subpoblaciones linfocitarias analizadas, donde pueden verse tanto aumentos como disminuciones de todas las poblaciones, sin encontrarse ningún patrón claro (**figura R25**).

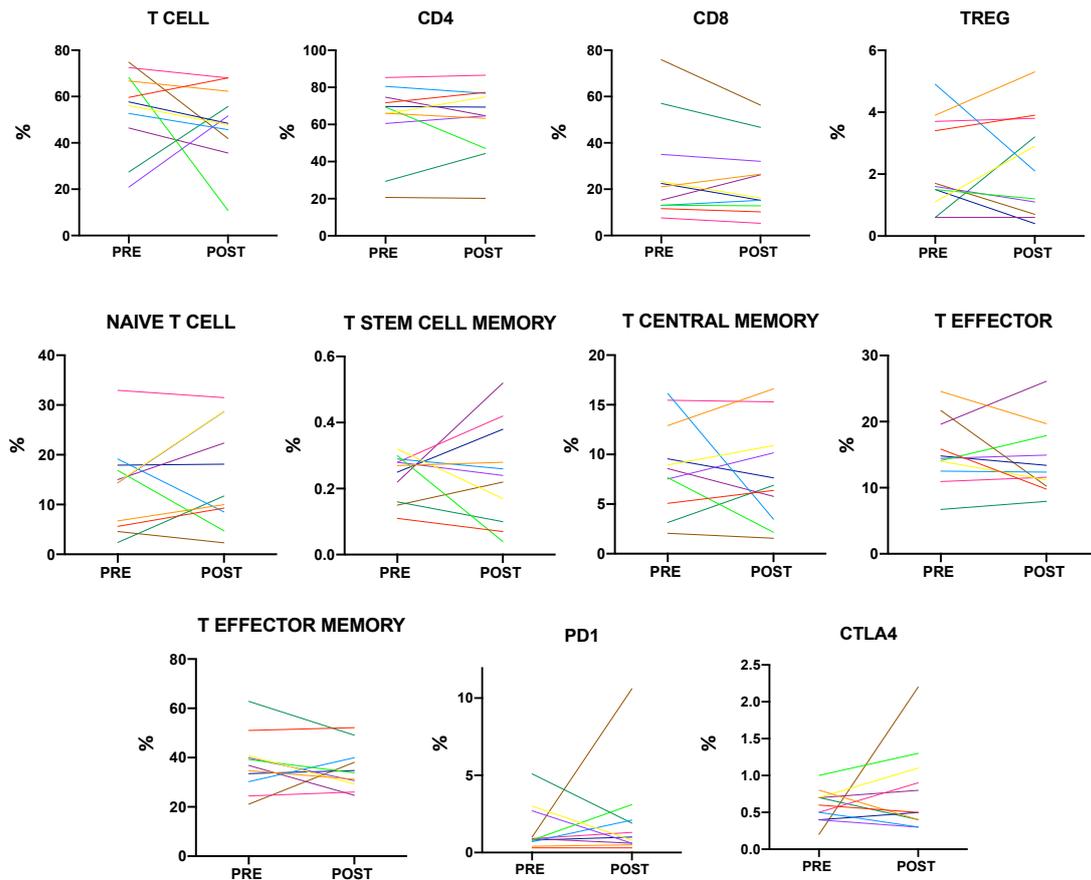


Figura R25. Valores individuales de las subpoblaciones linfocitarias en sangre (PBMCs) pre y post tratamiento. NAIVE T CELL (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO-); T EFFECTOR (CD62L-CCR7-CD45RA+CD45RO-); T EFFECTOR MEMORY (CD62L-CCR7-CD45RA-CD45RO+); T STEMCELL MEMORY (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO+); T CENTRAL MEMORY (CD62L+CCR7+CD45RA-CD45RO+); T REGULATORY (CD4+CD25++CD127low). PRE, muestras pre-tratamiento; POST, muestras a los 56 días del tratamiento.

2.4.4. RNAseq: *immune-signatures*

Se realizó la extracción de RNA en 25 biopsias tumorales procedentes de 16 pacientes. Cuatro biopsias pre tratamiento no pudieron analizarse debido a la baja calidad del RNA extraído, con lo que finalmente fueron analizadas 21 muestras. Se disponía de muestras apareadas pre y post tratamiento en 5 pacientes, mientras que el resto de biopsias correspondían a muestras de 10 pacientes pre tratamiento y 1 paciente post tratamiento. Mediante NGS, se llevó a cabo el análisis de expresión de distintos genes en las 21 muestras analizadas.

Tras el análisis de todas las muestras, se agruparon en 3 *clusters* diferentes de firmas inmuno-metabólicas, con distinto microambiente tumoral. También se compararon antes del

tratamiento y al día 56 del tratamiento, para ver cómo cambiaba el microambiente tumoral tras el tratamiento, pero el cambio sólo se observó en algunos pacientes.

Se analizó la expresión basal de distintos genes según la firma pro-inmune previamente publicada (GEP) y según la firma inmunometabólica publicada recientemente por nuestro grupo (IMMETCOLS), para evaluar si la eficacia al tratamiento estaba relacionada con estas firmas. La firma IMMETCOLS clasifica a los pacientes en 3 *clusters* metabólicos distintos (figura R26).

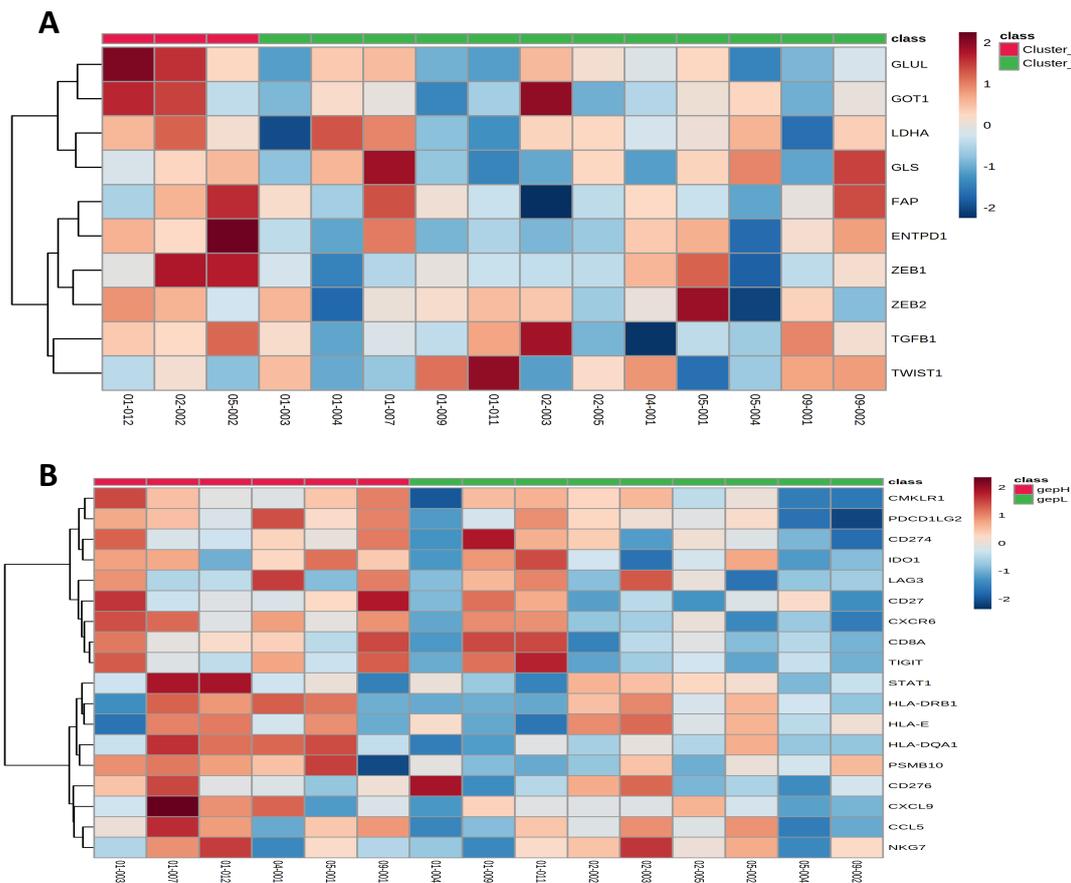


Figura R26. Firmas inmuno-metabólicas de las muestras basales (pre tratamiento). Immune-metabolic signature (IMMETCOLS) (A); Gene expression pro-immune signature (GEP) (B). Se agruparon los 15 pacientes en los cuales se disponía muestra pre tratamiento en diferentes *clusters*.

- Los tumores del *cluster* 1 muestran glucólisis aumentada, la vía de biosíntesis de hexosamina, macropinocitosis, síntesis de cetoácidos de cadena ramificada (BCKA), enriquecimiento de fibroblastos, de marcadores de EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) y de linfocitos T CD8+ exhaustos. También se observa un incremento de HIF-1a (*Hypoxia-inducible factor alpha*). En su conjunto, este cluster sugiere que el

metabolismo podría estar mediado por un microambiente tumoral con hipoxia, deprivado de glutamina y con alta infiltración inmune.

- Los tumores del *cluster 2* tienen incrementadas la oxidación de glutamina y de BCKA, así como también de la capacidad gluconeogénica/glucogénica necesaria para la supervivencia independiente de glucosa. Las enzimas implicadas en la síntesis de glutamina y de la β -oxidación de lípidos también están aumentadas.
- Los tumores del *cluster 3* se caracterizan por una regulación aumentada de SLC1A5 y SLC7A5, que promueven la dependencia de células tumorales de la glucosa y aumentan la necesidad de citosólica NADPH junto con la regulación al incrementada de G6PD. También sugiere la regulación positiva de prolina, y de piezas clave de la lanzadera de malato-aspartato, lo cual sugiere de una ganancia en la capacidad de carboxilación reductora.

En lo referente a los 15 pacientes analizados basalmente, en la firma IMMETCOLS se asociaron 12 pacientes (80%) al *cluster 3* y tres pacientes (20%) al *cluster 1*, mientras que ninguno se asoció al *cluster 2*. Esta distribución cambió tras el tratamiento: se asociaron 9 pacientes al *cluster 1* (60%), 3 pacientes al *cluster 2* (20%) y 3 pacientes al *cluster 3* (20%). De los 5 pacientes en los que se disponía de muestras apareadas pre y post tratamiento, sólo se observó el cambio de un *cluster* a otro en 1 paciente (01/007), que antes del tratamiento estaba se asociaba al *cluster 1* y después del tratamiento al *cluster 2*. En la **figura R27** podemos ver la distribución de los pacientes en los distintos *clusters* antes y después de haber recibido el tratamiento.

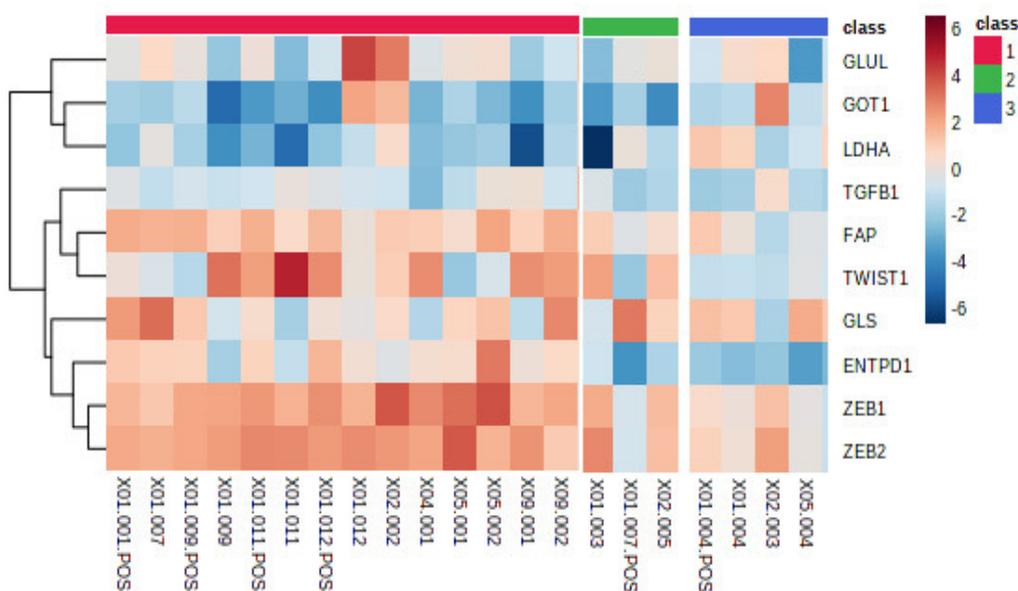


Figura R27. Firma inmuno-metabólica IMMETCOLS de las muestras pre y post tratamiento.

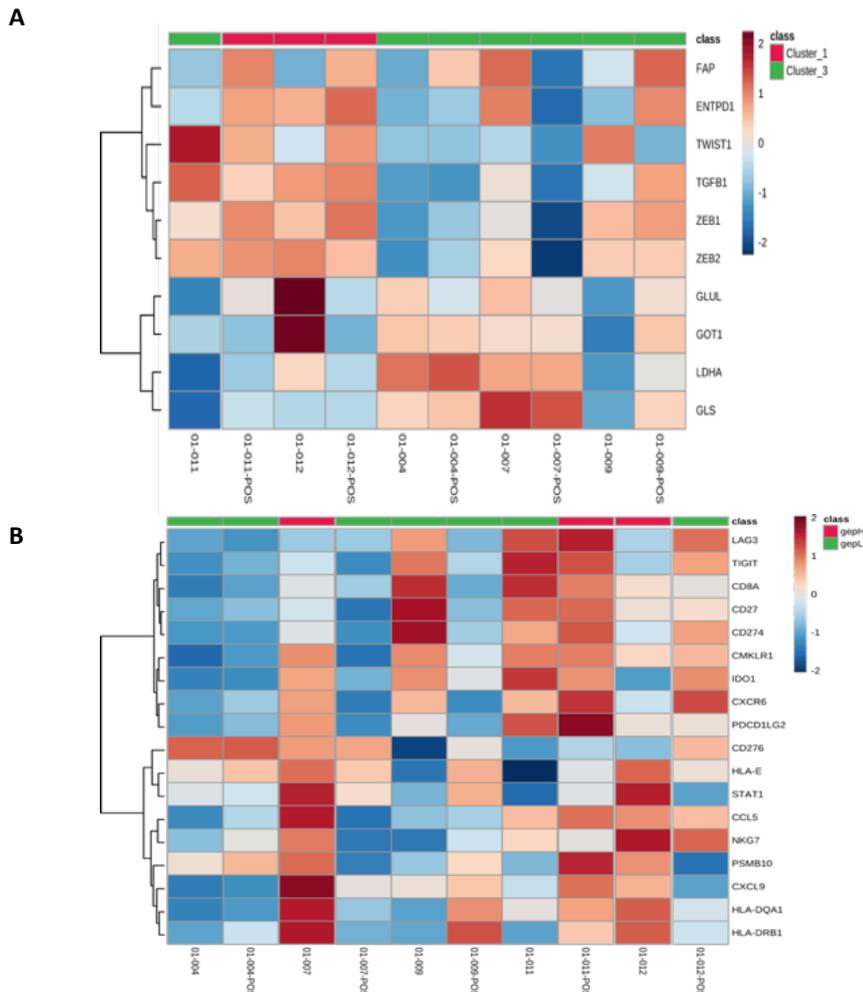


Figura R28. Firmas inmuno-metabólica en biopsias hepáticas antes y después del tratamiento.

Firma IMMETCOLS (A) y firma GEP (B).

Para ver la influencia que el tratamiento pudo ejercer sobre el microambiente tumoral y estas firmas inmunes, analizamos biopsias de metástasis hepáticas antes y después del tratamiento en 5 pacientes mediante ambas firmas (**figura R28**). Dos pacientes (01-007 y 01-012) cambiaron su firma GEP de *GEP_{high}* a *GEP_{low}* tras el tratamiento y un paciente (01-011) cambió de *GEP_{low}* a *GEP_{high}*. En la firma IMMETCOLS, 1 paciente (01-011) pasó del cluster 3 al cluster 1 tras el tratamiento.

De manera global, 143 genes cambiaron su expresión de manera significativa tras el tratamiento. La mayoría disminuyeron sus niveles de expresión tras el tratamiento. En la **tabla R7** podemos ver los 20 genes que disminuyeron su expresión en mayor medida, en comparación con las muestras pre-tratamiento. En la **figura R29** podemos ver las variaciones de todos los genes analizados, tanto los que cambiaron su expresión de manera significativa como los que no. Los procesos biológicos que experimentaron mayores cambios de expresión de genes fueron aquellos implicados en el metabolismo y transporte de lípidos (APO1A,

ANGPTL3, ADH1, APOA2, APOF, APOC3, RBP4, MTPP, APOA5, ABBC2, SLC27A5, LRP4), respuesta inflamatoria y regulación de la respuesta inmune efectora (PLA2G2A, HRG, SERPINC1, CFHR2, CFHR5, PLG, C9, F2, ARG1, CCL16, CPNE7) y metabolismo y transporte del ácidos carboxílicos, hidroxi orgánicos y compuestos ácidos (ADH1A, TAT, PON1, CES1, CYP2E1, ACSM2A, CDO1, UGT2B4, UGT2B7, PIPOX).

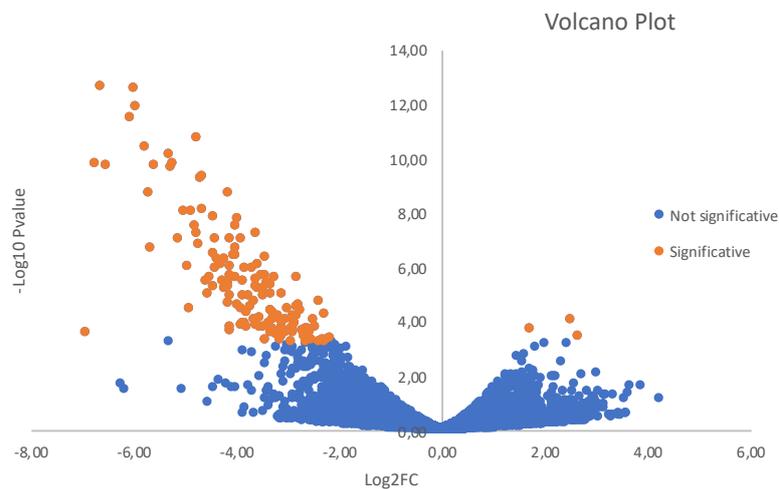


Figura R29. *Volcano plot* representando los genes analizados que cambiaron su expresión de manera significativa (en naranja) y no significativa (en azul)

Tabla R7. Top 20 genes que disminuyeron su expresión post-tratamiento en comparación con las muestras pre-tratamiento.

Gene.name	log2FoldChange	"-Log10 Pvalue"	p value
APOA1	-6,61	12,67	2,16E-13
PLA2G2A	-6,00	12,57	2,72E-13
F9	-5,93	11,94	1,14E-12
ANGPTL3	-6,05	11,51	3,11E-12
HRG	-4,75	10,76	1,73E-11
ADH1A	-5,77	10,42	3,77E-11
APOA2	-5,29	10,16	6,90E-11
CPN2	-5,22	9,85	1,41E-10
APOF	-6,73	9,80	1,60E-10
APOC3	-6,52	9,74	1,81E-10
CFHR2	-5,58	9,72	1,89E-10
TAT	-5,26	9,70	1,99E-10
KNG1	-4,66	9,32	4,80E-10
PLG	-4,70	9,29	5,09E-10
AFM	-5,68	8,76	1,76E-09
MTTP	-4,16	8,72	1,91E-09
APOA5	-4,64	8,14	7,27E-09
CYP8B1	-4,87	8,05	8,83E-09
SAA2	-4,99	8,04	9,05E-09
C9	-4,42	7,87	1,36E-08

2.4.5. Tipificación HLA

De cara al posterior análisis de correlación entre los diferentes alelos HLA y la respuesta clínica al tratamiento, se realizó la tipificación de los alelos HLA de los 18 pacientes evaluables incluidos en el ensayo clínico (**tabla R8**).

Tabla R8. Tipificación HLA de los pacientes evaluables incluidos en el estudio. Los alelos analizados fueron A*, B*, C*, DRB1*, DQB1* y DQA1* (página siguiente).

Paciente	Respuesta	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQA1
02-003	HPD	A*02:01P, A*-	B*2018:01P, B*44:02P	C*05:01P, C*05:01P	DRB1*03:01P, DRB1*09:01P	DQB1*02:01, DQB1*03:03P	DQA1*03:01P, DQA1*05:01P
01-003	HPD	A*01:01P, A*02:01P	B*08:01P, B*44:02P	C*05:01P, C*07:01P	DRB1*04:02P, DRB1*08:01P	DQB1*03:02P, DQB1*04:02P	DQA1*03:01P, DQA1*04:01P
01-004	HPD	A*02:01P, A*30:02P	B*2018:01P, B*44:02P	C*05:01P, C*05:01P	DRB1*03:01P, DRB1*04:01P	DQB1*02:01, DQB1*03:02P	DQA1*03:01P, DQA1*05:01P
05-002	HPD	A*02:01P, A*24:02P	B*44:02P, B*51:01P	C*05:01P, C*15:02P	DRB1*13:01P, DRB1*14:01P	DQB1*05:03P, DQB1*06:03P	DQA1*01:03P, DQA1*01:01P
01-007	PE	A*01:01P, A*24:02P	B*15:01P, B*49:01P	C*03:03P, C*07:01P	DRB1*13:01P, DRB1*16:01P	DQB1*05:02P, DQB1*06:03P	DQA1*01:02P, DQA1*01:03P
01-009	PE	A*11:01P, A*32:01P	B*27:05P, B*35:01P	C*02:02P, C*04:01P	DRB1*01:01P, DRB1*11:02P	DQB1*03:01P, DQB1*05:01P	DQA1*01:01P, DQA1*05:01P
01-012	PE	A*03:01P, A*32:01P	B*35:01P, B*-	C*04:01P, C*-	C*04:01P, C*-	DQB1*03:02P, DQB1*05:01P	DQA1*01:01P, DQA1*03:01P
02-002	PE	A*01:01P, A*02:01P	B*27:02P, B*57:01P	C*02:02P, C*06:02P	DRB1*11:01P, DRB1*-	DQB1*03:01P, DQB1*-	DQA1*05:01P, DQA1*-
02-005	PE	A*02:01P, A*-	B*2018:01P, B*51:01P	C*07:01P, C*15:02P	DRB1*07:01P, DRB1*11:04P	DQB1*02:01, DQB1*02:02	DQA1*02:01P, DQA1*05:01P
04-001	PE	A*02:01P, A*23:01P	B*07:02P, B*49:01P	C*07:01P, C*07:02P	DRB1*11:01P, DRB1*15:01P	DQB1*03:01P, DQB1*06:02P	DQA1*01:02P, DQA1*05:01P
05-001	PE	A*02:01P, A*11:01P	B*39:01P, B*57:01P	C*06:02P, C*12:03P	DRB1*01:01P, DRB1*04:02P	DQB1*03:02P, DQB1*05:01P	DQA1*01:01P, DQA1*03:01P
05-004	PE	A*23:01P, A*24:02P	B*07:02P, B*44:03P	C*07:02P, C*16:01P	DRB1*01:03P, DRB1*15:01P	DQB1*05:01P, DQB1*06:02P	DQA1*01:01P, DQA1*01:02P
05-006	PE	A*01:01P, A*02:01P	B*49:01P, B*57:01P	C*07:01P, C*-	DRB1*04:04P, DRB1*07:01P	DQB1*03:02P, DQB1*03:03P	DQA1*02:01P, DQA1*03:01P
09-001	PE	A*29:02P, A*32:01P	B*14:01P, B*44:03P	C*08:02P, C*16:01P	DRB1*07:01P, DRB1*-	DQB1*02:02, DQB1*-	DQA1*02:01P, DQA1*-
01-001	EE	A*01:01P, A*02:01P	B*08:01P, B*40:02P	C*07:01P, C*15:02P	DRB1*03:01P, DRB1*08:01P	DQB1*02:01, DQB1*04:02P	DQA1*04:01P, DQA1*05:01P
01-008	EE	A*24:02P, A*25:01P	B*35:03P, B*51:01P	C*03:03P, C*04:01P	DRB1*09:01P, DRB1*11:15P	DQB1*03:01P, DQB1*03:03P	DQA1*03:01P, DQA1*05:01P
01-011	EE	A*02:01P, A*03:01P	B*45:01P, B*51:01P	C*06:02P, C*07:02P	DRB1*04:04P, DRB1*13:02P	DQB1*03:02P, DQB1*06:09P	DQA1*01:02P, DQA1*03:01P
05-005	EE	A*01:01P, A*29:02P	B*08:01P, B*44:03P	C*07:01P, C*16:01P	DRB1*03:01P, DRB1*07:01P	DQB1*02:01, DQB1*02:02	DQA1*02:01P, DQA1*05:01P

2.5. Detección de biomarcadores de respuesta al tratamiento combinado

2.5.1. Citocinas

De las 16 citocinas analizadas, se detectaron niveles séricos pre y/o post tratamiento en 8 de ellas. De ellas, todas se asocian a mal pronóstico en cáncer, excepto RANTES y SDF1a, que aparecen tras una estimulación del sistema inmune.

Para estudiar si los niveles de algunas de estas 8 citocinas se podían relacionar con la respuesta al tratamiento, se compararon distintos grupos de pacientes en función de su respuesta clínica.

En primer lugar, se dividió a los pacientes en 2 grupos en función de su **supervivencia**: aquellos que mostraron una supervivencia superior a la media se definieron como *long survivals* (LS) y aquellos que mostraron una supervivencia inferior a la media se definieron como *short survivals* (SS). De las 8 citocinas analizadas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en SDF1a, MMP-9 y VEGF-C.

Con respecto a SDF1a, sólo disminuye de manera significativa en el grupo de los LS ($p=0,0156$) y no en el grupo SS ($p=0,6875$) (**figura R30A**), lo cual resulta sorprendente, ya que esta citocina se asocia a una estimulación del sistema inmune, con lo que podemos decir que esta citocina no sería un biomarcador adecuado de respuesta. Tampoco encontramos diferencias al comparar los niveles pre-tratamiento y post-tratamiento entre los dos grupos de diferente supervivencia.

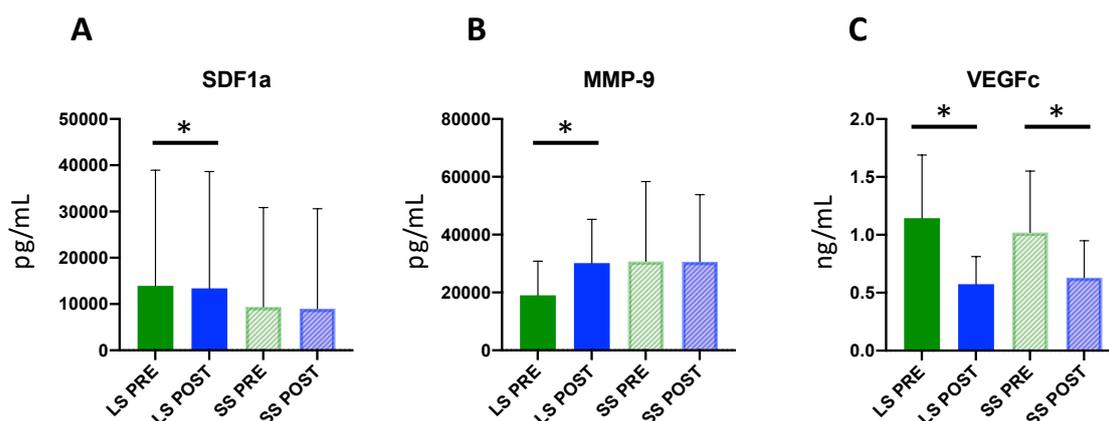


Figura R30. Niveles de citocinas – supervivencia. Niveles de citocinas que cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia. LS, long survival; SS, short survival; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Con respecto a MMP-9, los niveles aumentaron de manera estadísticamente significativa tras el tratamiento en el grupo de LS ($p=0,0391$) pero no en el grupo de SS ($p>0,99$) (**figura**

R30B). Este aumento, por tanto, permitiría relacionar MMP-9 como una citocina de buen pronóstico en este tipo de pacientes, a pesar de ser una citocina que se asocia a mal pronóstico. Al igual que sucedía con SDF1a, tampoco encontramos diferencias al comparar los niveles pre-tratamiento y post- tratamiento entre los dos grupos de diferente supervivencia.

En el caso de VEGF-C, sus niveles disminuyeron de manera significativa tanto en LS como en SS ($p=0,0078$ y $p=0,0156$, respectivamente) (**figura R30C**), aunque esta disminución fue más acusada en el grupo de LS. Aunque esta disminución en los niveles de VEGF-C es un buen indicador de la estimulación del sistema inmune y por tanto de la respuesta al tratamiento, puesto que sus niveles disminuyen en ambos grupos de pacientes, no nos sirve como biomarcador para discriminar una mejor respuesta clínica al tratamiento. No encontramos diferencias significativas al comparar los niveles pre-tratamiento y post- tratamiento entre los dos grupos de diferente supervivencia.

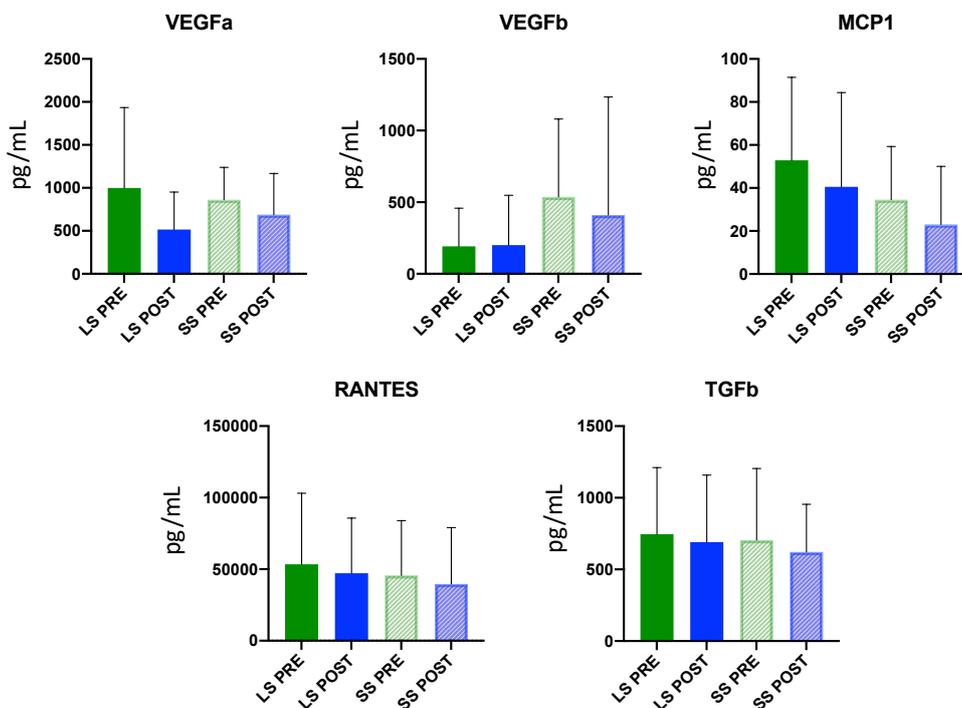


Figura R31. Niveles de citocinas – supervivencia. Niveles de citocinas que no cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia. LS, *long survival*; SS, *short survival*; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En relación al resto de citocinas analizadas, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles entre los dos grupos de LS y SS (**figura R31**). Los valores de significación estadística de todos los grupos y citocinas están incluidos en la **tabla R9**.

Tabla R9. Valores estadísticos de p de los niveles de citocinas en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de su supervivencia.

	PRE vs POST	LS vs SS			
		PRE vs POST LS	PRE vs POST SS	PRE vs PRE	POST vs POST
SDF1a (CXCL12)	0,0479	0,0156	0,6875	0,5344	0,7567
VEGFB	0,8311	>0,9999	0,9375	0,0860	0,2478
MCP1 (CCL2)	0,0443	0,1641	0,2969	0,3510	0,8371
VEGFa	0,0739	0,0977	0,5781	>0,9999	0,4698
MMP-9	0,1928	0,0391	>0,9999	0,920182	0,6806
RANTES (CCL5)	0,8999	>0,9999	>0,9999	0,8371	0,6806
TGFb	0,7436	>0,9999	0,6875	0,920182	0,920182
VEGFc	<0,0001	0,0078	0,0156	0,7369	0,8173

LS, long survival; SS, short survival; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En segundo lugar, se estudiaron los distintos niveles de las citocinas en relación a los pacientes con **hiperprogresión**, para lo cual se dividió a los pacientes en 2 grupos: aquellos que habían experimentado hiperprogresión (HPD) y aquellos que no (PD). De las 8 citocinas analizadas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en SDF1a, VEGF-A y VEGF-C (**figura R32**).

En los 3 casos, los niveles de citocinas descendieron de manera significativa tras el tratamiento sólo en el grupo de PD. En cuanto a SDF1a, en el grupo de HPD los niveles aumentan (aunque no de manera significativa), lo cual podría explicarse porque durante la hiperprogresión se produce también una sobre-estimulación del sistema inmune y que podría coincidir con el momento en el cual se recogió la muestra para analizarla. Los niveles de VEGF-A aumentaron post-tratamiento en el grupo de HPD (aunque no significativamente), lo cual se puede asociar con el empeoramiento de la enfermedad. No encontramos diferencias significativas al comparar los niveles pre-tratamiento y post- tratamiento entre los dos grupos de HPD.

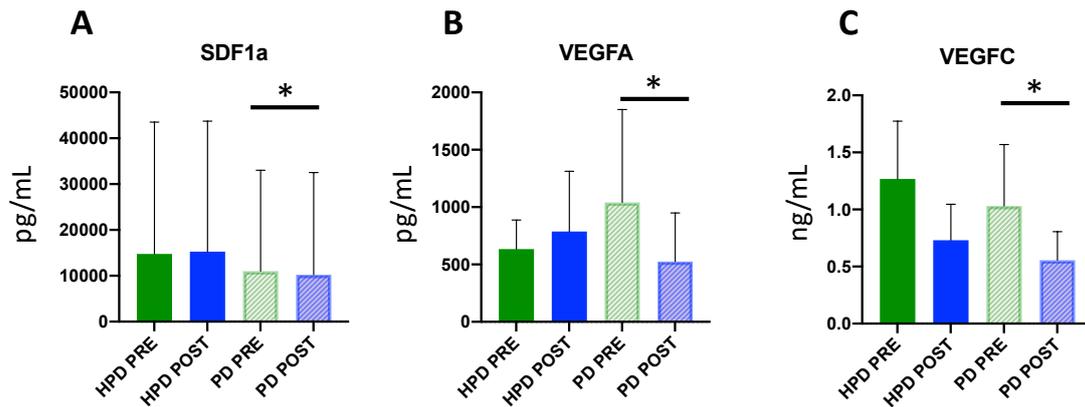


Figura R32. Niveles de citocinas – hiperprogresión. Niveles de citocinas que cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia: SDF1a (A), VEGFA (B) y VEGFC (C). HPD, hiperprogresión; PD, progresión; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En relación al resto de citocinas analizadas, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles entre los dos grupos de HPD y PD (**figura R33**). Los valores de significación estadística de todos los grupos y citocinas pueden verse en la **tabla R10**.

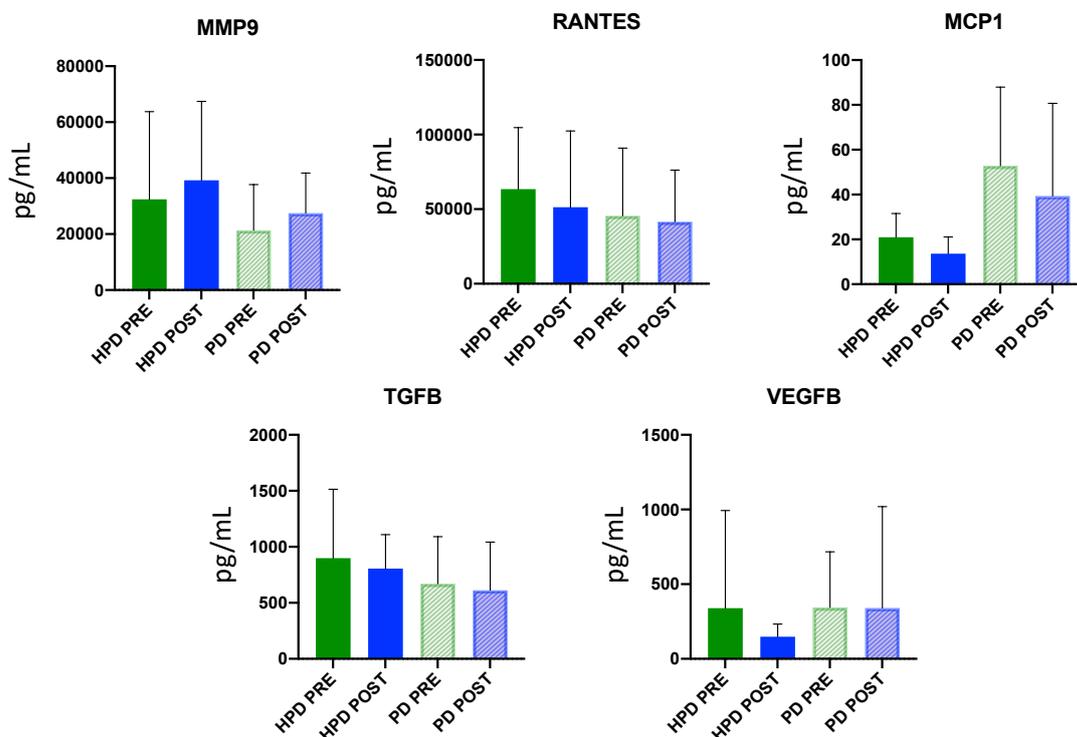


Figura R33. Niveles de citocinas – hiperprogresión. Niveles de citocinas que no cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia: MMP-9, RANTES, MCP-1, TGf β y VEGFB. HPD, hiperprogresión; PD, progresión; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Tabla R10. Valores estadísticos de p de los niveles de citocinas en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de si experimentaron o no hiperprogresión.

	HPD			
	PRE vs POST HPD	PRE vs POST PD	PRE vs PRE	POST vs POST
SDF1a (CXCL12)	>0,9999	0,0137	0,520187	0,8599
VEGFB	0,8750	0,8125	0,9747	0,2346
MCP1 (CCL2)	0,6250	0,0640	0,1033	0,6835
VEGFa	0,6250	0,0269	0,3791	0,3791
MMP-9	>0,9999	0,1099	0,8615	0,6835
RANTES (CCL5)	>0,9999	0,9697	0,3791	0,9527
TGFb	>0,9999	0,9097	0,6835	0,2615
VEGFc	0,1250	0,0015	0,4313	0,3022

HPD, hiperprogresión; PD, progresión de la enfermedad; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En tercer lugar, se compararon los distintos niveles de las citocinas en relación a la **enfermedad estable**, para lo cual se dividió a los pacientes en 2 grupos: pacientes que progresaron (PD) y pacientes que consiguieron estabilizar la enfermedad (SD).

De las 8 citocinas analizadas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en 4 de ellas: SDF1a, VEGF-C, MCP-1 y MMP-9 (**figura R34**).

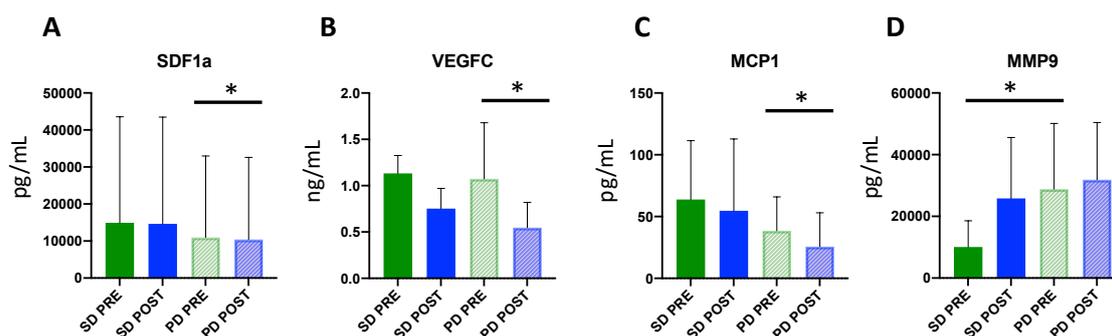


Figura R34. Niveles de citocinas – enfermedad estable. Niveles de citocinas que cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia: SDF1a (A), VEGFC (B), MCP1 (C) y MMP-9 (D). SD, enfermedad estable; PD, progresión; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Los niveles de SDF1a disminuyeron tras el tratamiento sólo en el grupo de los pacientes que progresaron ($p=0,048$, **figura R34A**), lo cual podría ser un indicador de mal pronóstico, ya que sus niveles se mantienen más elevados en los pacientes con enfermedad estable.

Los niveles de VEGF-C y MCP-1 disminuyen significativamente sólo en el grupo de PD ($p=0,0269$ y $p=0,0005$, **figura R34B y R34C**), lo cual resulta inesperado, ya que cabría esperar que sus niveles disminuyeran de manera más acusada en el grupo de SD, por lo tanto, la medición de estas citocinas no nos permitiría discriminar pacientes con mejor respuesta clínica.

No encontramos diferencias significativas al comparar los niveles pre-tratamiento y post-tratamiento entre los dos grupos de PD y SD, excepto en el caso de MMP-9 (**figura R34D**), cuyos niveles pre-tratamiento son menores en el grupo de pacientes con SD ($p=0,0418$). Esto podría indicar que los pacientes con menores niveles basales de MMP-9 parten de un entorno menos inmunosuprimido que permite alcanzar una enfermedad estable con mayor probabilidad.

En relación al resto de citocinas analizadas, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles entre los dos grupos de SD y PD (**figura R35**). Los valores de significación estadística de todos los grupos y citocinas pueden verse en la **tabla R11**.

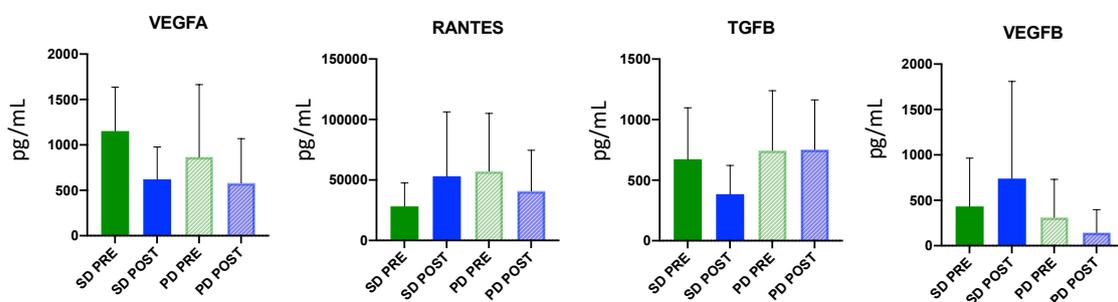


Figura R35. Niveles de citocinas – enfermedad estable. Niveles de citocinas que no cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de la supervivencia: VEGFA, RABTES, TGFB y VEGFB. SD, enfermedad estable; PD, progresión; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Tabla R11. Valores estadísticos de p de los niveles de citocinas en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de si experimentaron o no enfermedad estable.

	SD			
	PRE vs POST SD	PRE vs POST otros	PRE vs PRE	POST vs POST
SDF1a (CXCL12)	0,5000	0,0488	0,8599	0,52018
VEGFB	0,5000	0,3594	0,9253	0,7407
MCP1 (CCL2)	0,8750	0,0269	0,2615	0,6835
VEGFa	0,1250	0,3013	0,3165	0,6835
MMP-9	0,1250	0,6221	0,0420	0,5209
RANTES (CCL5)	0,6250	0,9097	0,4462	0,9527
TGFb	0,2500	0,8501	0,8615	0,1703
VEGFc	0,2500	0,0005	0,5368	0,2484

SD, enfermedad estable; PD, progresión de la enfermedad; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Por último, se compararon los distintos niveles de las citocinas en relación a las distintas firmas de expresión inmunitarias de RNAseq, para lo cual se dividió a los pacientes en 2 grupos: pacientes con la firma que presenta un entorno más inmunosuprimido, GEP low-IMMETCOLS low (GEPI/IMMI) y pacientes que tenían el resto de firmas (OTROS).

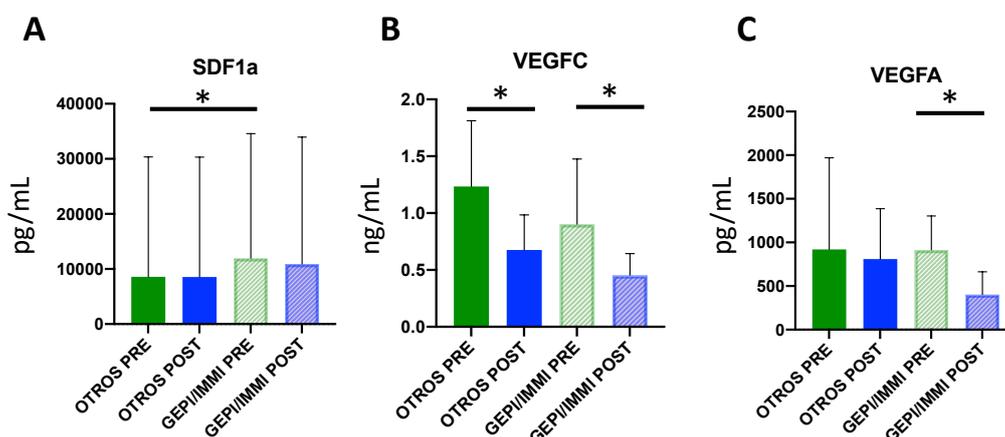


Figura R36. Niveles de citocinas – firmas inmuno-metabólicas. Niveles de citocinas que cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de las firmas de expresión inmuno-metabólicas: SDF1a (A), VEGFC (B), VEGFC (C) y VEGFA (D). GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; OTROS, pacientes que tenían el resto de firmas; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

De las 8 citocinas analizadas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en SDF1a, VEGF-C y VEGF-A (**figura R36**).

Los niveles de SDF1a son más elevados pre-tratamiento en el grupo GEPI/IMMI ($p=0,0361$, **figura R36A**), lo cual es sorprendente ya que este grupo está más inmunosuprimido y esperaríamos unos niveles más bajo que en el resto de pacientes que presentan unas firmas de expresión más inmuno-activadas.

Los niveles de VEGF-C disminuyen tras el tratamiento en ambos grupos de pacientes, aunque de manera menos significativa en el grupo GEPI/IMMI ($p=0,0312$ vs $p=0,0156$, **figura R36B**), lo cual nos refleja el entorno más inmunosupresor de este grupo y podríamos tomar una bajada acusada en los niveles de esta citocina como un indicador de un microambiente tumoral menos inmunosupresor.

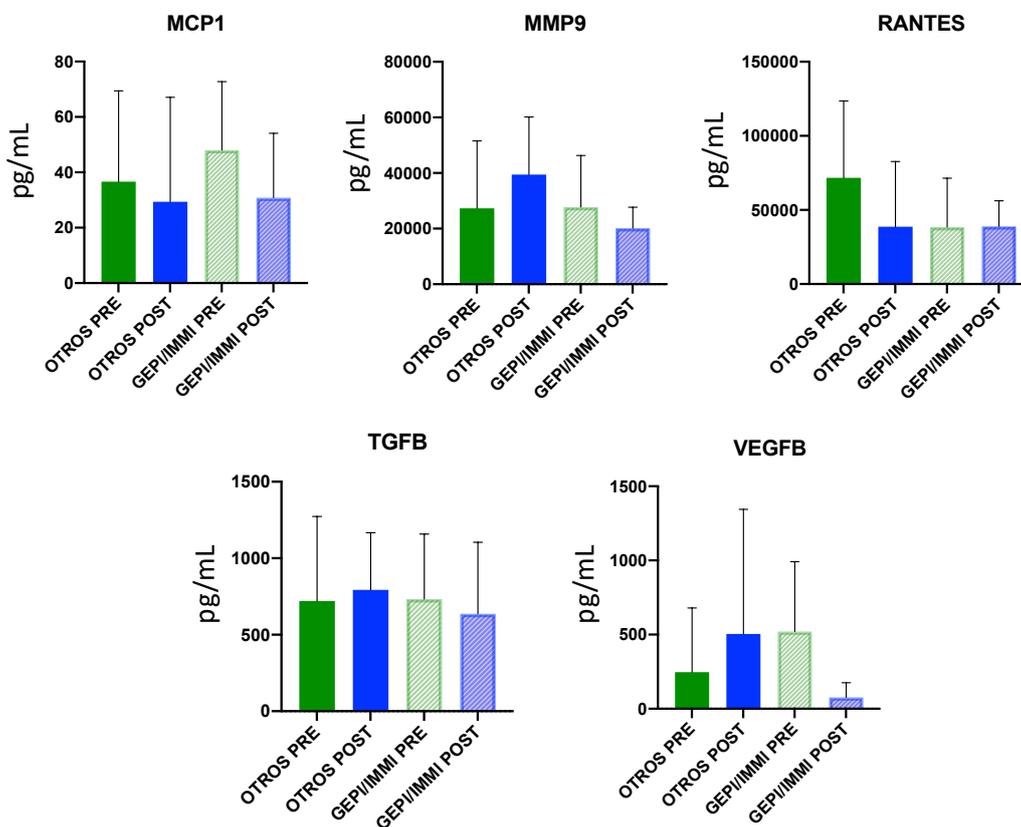


Figura R37. Niveles de citocinas – firmas inmuno-metabólicas. Niveles de citocinas que no cambiaron sus niveles de forma estadísticamente significativa en función de las firmas de expresión inmuno-metabólicas: MCP-1, MMP-9, RANTES, TGf β , VEGFB. GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; OTROS, pacientes que tenían el resto de firmas; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Los niveles de VEGF-A disminuyen tras el tratamiento sólo de manera significativa en el grupo OTROS ($p=0,0312$, **figura R36C**). Esto nos podría servir para utilizar VEGF-A como indicador en los pacientes que se poseen un microambiente más inmunosuprimido, ya que en este grupo de pacientes veremos que los niveles de esta citocina y, por tanto, la inmunosupresión, no disminuyen.

En relación al resto de citocinas analizadas, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles entre los dos grupos de firmas de expresión génica (**figura R37**). Los valores de significación estadística de todos los grupos y citocinas pueden verse en la **tabla R12**.

Tabla R12. Valores estadísticos de p de los niveles de citocinas en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de las diferentes firmas de expresión inmunes.

	IMMUNE SIGNATURE			
	PRE vs POST low/low	PRE vs POST otros	PRE vs PRE	POST vs POST
SDF1a (CXCL12)	0,3125	0,3125	0,0361	0,1445
VEGFB	0,0625	0,0625	0,1917	0,4138
MCP1 (CCL2)	0,0625	0,5781	0,4452	0,4452
VEGFa	0,0312	>0,9999	0,2949	0,3660
MMP-9	0,6875	0,220188	0,6282	0,1014
RANTES (CCL5)	0,4375	0,2969	0,2949	0,2343
TGFb	0,8438	0,4688	0,7308	0,4452
VEGFc	0,0312	0,0156	0,2949	0,1684

GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; OTROS, pacientes que tenían el resto de firmas; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En resumen, podemos decir que con los análisis que hemos realizado en los 16 pacientes evaluables incluidos en el estudio clínico, las citocinas medidas a nivel sérico que podrían servir potencialmente como biomarcadores de respuesta clínica serían: SDF1a, MMP-9 y VEGF-C.

2.5.2. Proliferaciones linfocitarias

Se analizaron los distintos datos de proliferación linfocitaria, tanto en presencia de cada una de las terapias por separado (células dendríticas con lisado tumoral y anti-PD-L1) como conjuntamente, comparando las distintas ratios de proliferación entre distintos grupos de pacientes en función de su respuesta clínica. Debido a que sólo se disponían datos de

proliferaciones pre y post tratamiento en 7 pacientes, los análisis se realizaron sólo comparando pacientes con o sin hiperprogresión (HPD).

Como puede verse en las gráficas de la **figura R38**, los pacientes (n=7) con HPD mostraron una mayor proliferación linfocitaria tras el tratamiento (aunque no de manera significativa), tanto si observamos el efecto sólo de la vacuna (**figura R38B**) como en el caso del tratamiento combinado (**figura R38A**), probablemente debido a la hiper-estimulación recibida por el sistema inmune tras este aumento exacerbado del tumor. Por lo tanto, la medida de la proliferación de los linfocitos T in vitro no permite evaluar la respuesta clínica al tratamiento y el efecto in vitro del tratamiento sobre la capacidad de proliferación de los linfocitos T.

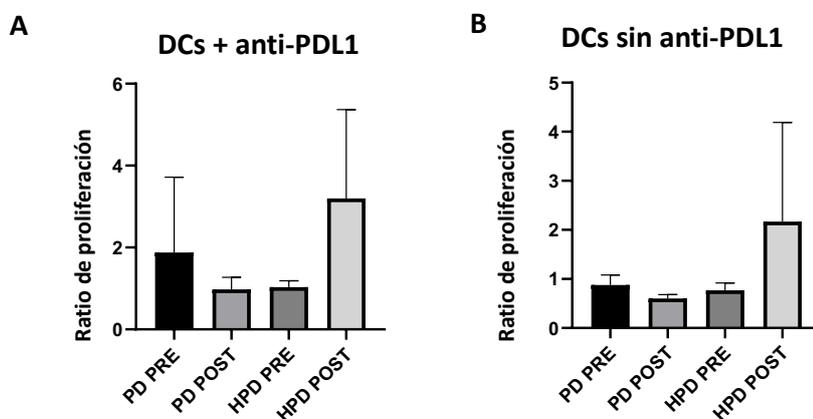


Figura R38. Proliferación linfocitaria en muestras de pacientes con hiperprogresión (HPD) y no hiperprogresión (PD). Efecto de la terapia combinada de vacuna + anti-PDL1 (A) y de la vacuna solamente (B). DCs, células dendríticas; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Los análisis para encontrar biomarcadores de respuesta asociados a proliferación linfocitaria resultan muy limitados debido al bajo número de pacientes en cada uno de los subgrupos, con lo que no podemos sacar conclusiones claras.

2.5.3. Subpoblaciones linfocitarias (PBMCs)

Se analizaron diferentes subpoblaciones linfocitarias en 11 pacientes en los cuales se disponía de muestras de sangre periférica pre y post tratamiento. Se evaluaron las proporciones de células *naïve* (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO-), *effector* (CD62L-CCR7-CD45RA+CD45RO-), *stem memory* (CD62L+CCR7+CD45RA+CD45RO+), *central memory* (CD62L+CCR7+CD45RA-CD45RO+), *effector memory* (CD62L-CCR7-CD45RA-CD45RO+) T reguladoras (CD4+CD25++CD127low), así como la expresión de PD-1 y CTLA-4 en linfocitos CD4 y CD8.

Para estudiar si los niveles de algunas de estas 10 subpoblaciones analizadas se podían relacionar con la respuesta al tratamiento, se compararon distintos grupos de pacientes en función de su respuesta clínica.

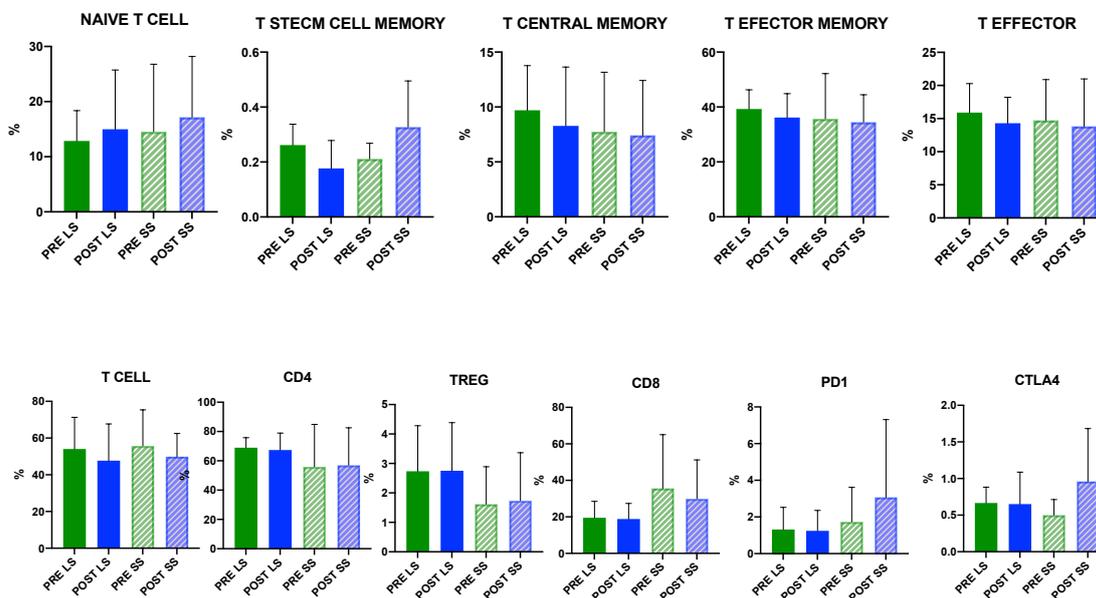


Figura R39. Subpoblaciones linfocitarias – supervivencia. Niveles de las distintas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en muestras pre y post tratamiento agrupadas en función de la supervivencia de los pacientes. LS, *long survival*; SS, *short survival*; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

En primer lugar, se dividió a los pacientes en 2 grupos en función de su **supervivencia**: aquellos que mostraron una supervivencia superior a la media se definieron como *long survivals* (LS) y aquellos que mostraron una supervivencia inferior a la media se definieron como *short survivals* (SS). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las poblaciones analizadas. Tampoco encontramos diferencias significativas al comparar los porcentajes de las distintas subpoblaciones pre-tratamiento y post- tratamiento entre los dos grupos de diferente supervivencia (**figura R39**).

No se realizó este tipo de análisis entre los pacientes con HPD y el resto de pacientes, ya que sólo se disponía de datos de las subpoblaciones linfocitarias en 2 pacientes del grupo de HPD, con las limitaciones asociadas a realizar comparaciones en un grupo con una n tan baja.

En segundo lugar, se compararon las distintas subpoblaciones en relación a las distintas **firmas de expresión inmunes**, para lo cual se dividió a los pacientes en 2 grupos: pacientes con la firma que presenta un entorno más inmunosuprimido, GEP low-IMMETCOLS low (GEP/IMMI) y pacientes que tenían el resto de firmas (OTROS). No detectamos diferencias estadísticamente significativas en ningunas de las poblaciones analizadas ni al comparar los

porcentajes de las distintas subpoblaciones pre-tratamiento y post- tratamiento entre los dos grupos de diferente supervivencia (**figura R40**).

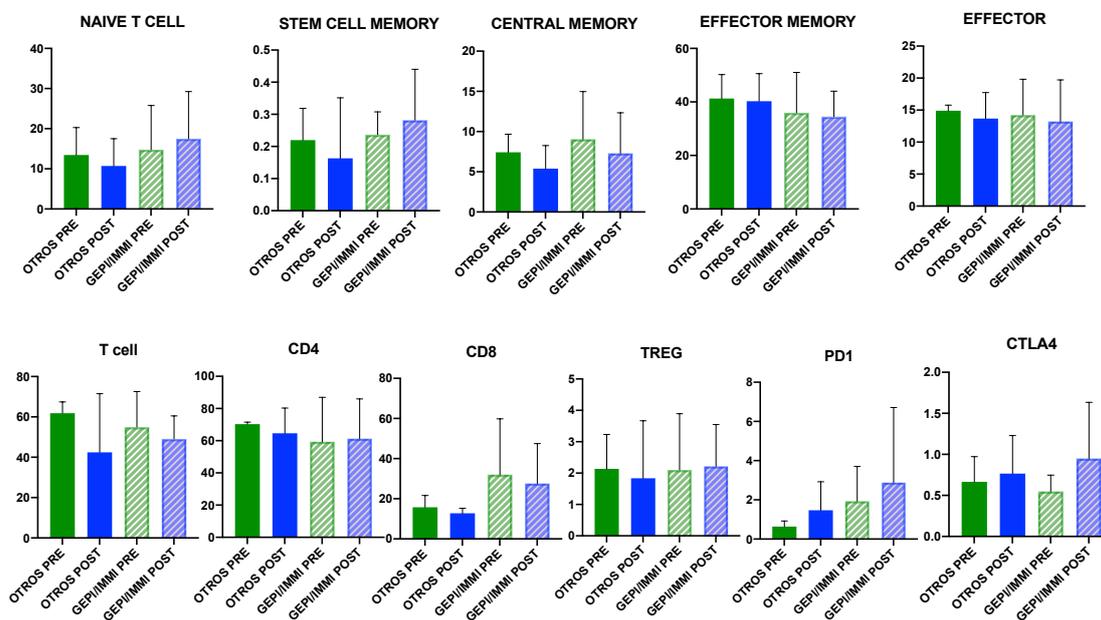


Figura R40. Subpoblaciones linfocitarias – firmas inmuno-metabólicas. Niveles de las distintas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en muestras pre y post tratamiento agrupadas en función de las firmas de expresión inmuno-metabólicas. GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; OTROS, pacientes que tenían el resto de firmas. PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

No se realizó este tipo de análisis entre los pacientes con enfermedad estable y el resto de pacientes, ya que sólo se disponía de datos de las subpoblaciones linfocitarias en 2 pacientes del grupo de enfermedad estable, con las limitaciones asociadas a realizar comparaciones en un grupo con una n tan baja.

Los valores de significación estadística de todos los grupos y subpoblaciones pueden verse en la **tabla R13**.

Tabla R13. Valores estadísticos de p de los niveles de subpoblaciones linfocitarias en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de la supervivencia y de las diferentes firmas de expresión inmunes.

	Long Survival vs Short Survival					IMMUNE SIGNATURE			
	PRE vs POST	PRE vs POST LS	PRE vs POST SS	PRE vs PRE	POST vs POST	PRE vs POST low/low	PRE vs POST otros	PRE vs PRE	POST vs POST
NAIVE	0,3652	0,5625	0,6250	>0,9999	0,6623	0,6875	>0,9999	0,9048	0,5476
STEM CELL MEMORY	>0,9999	0,0625	0,1250	0,1385	0,1775	0,6875	0,7500	0,9048	0,2619
CENTRAL MEMORY	0,8984	>0,9999	0,6250	0,6623	0,7922	0,6875	0,5000	0,9048	0,9048
EFFECTOR MEMORY	0,4648	0,4375	>0,9999	0,3290	0,7922	0,8438	>0,9999	0,5476	0,5476
EFFECTOR	0,5771	0,4375	>0,9999	0,9307	0,6623	>0,9999	0,7500	0,5476	0,7143
T CELL	0,3652	0,8438	0,4375	0,7922	0,9805	0,3125	0,5000	0,5476	0,9643
CD4	0,9658	0,8438	>0,9999	>0,9999	0,6623	0,8438	0,7500	>0,9999	0,9048
TREG	0,9434	0,8750	>0,9999	0,2619	0,2468	>0,9999	0,7500	0,8452	0,9048
CD8	0,2402	0,6875	0,4375	0,5368	0,5714	0,4375	0,2500	0,5476	0,1905
PD1	0,8457	>0,9999	0,8125	0,2641	0,3528	>0,9999	0,5000	0,0714	0,7143
CTLA4	0,5605	0,8438	0,3125	0,3333	0,4069	0,2812	0,7500	0,8571	>0,9999

LS, long survival; SS, short survival; PRE, muestras pre tratamiento; POST, muestras post tratamiento.

Por tanto, podemos decir que no hemos encontrado en el grupo de pacientes analizados en el estudio clínico, ninguna subpoblación linfocitaria que nos sirva como biomarcador de respuesta al tratamiento combinado, ya que no hemos encontrado ninguna diferencia significativa de la frecuencia de estas poblaciones entre los distintos subgrupos de pacientes.

2.5.4. Fenotipo de las células dendríticas presentes en la vacuna terapéutica

Para evaluar si el fenotipo de las células dendríticas presentes en la vacuna podía tener influencia sobre la respuesta clínica obtenida, se analizaron los distintos niveles de los 5 marcadores estudiados (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7) en los distintos grupos de pacientes.

En primer lugar, se dividió a los pacientes en 2 grupos en función de si presentaron **enfermedad estable** (EE) o progresión de la enfermedad (PE). Se analizaron los niveles de los 5 marcadores, tanto en % (**figura R41**) como en MFI (**figura R42**). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados.

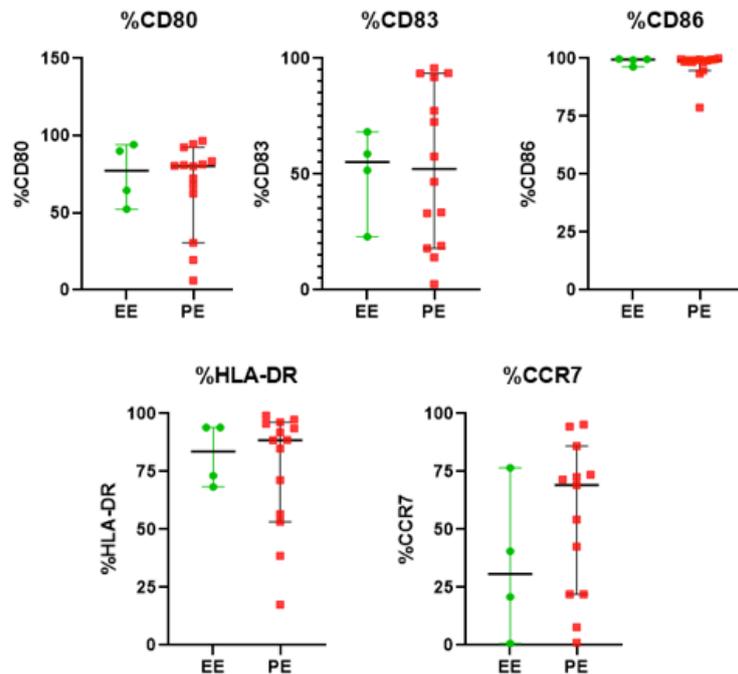


Figura R41: Fenotipo de las células dendríticas – enfermedad estable. Niveles (%) de los distintos marcadores de activación (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7) de las células dendríticas presentes en la vacuna terapéutica agrupados en función de la respuesta al tratamiento. EE, enfermedad estable (verde); PE, progresión de la enfermedad (rojo).

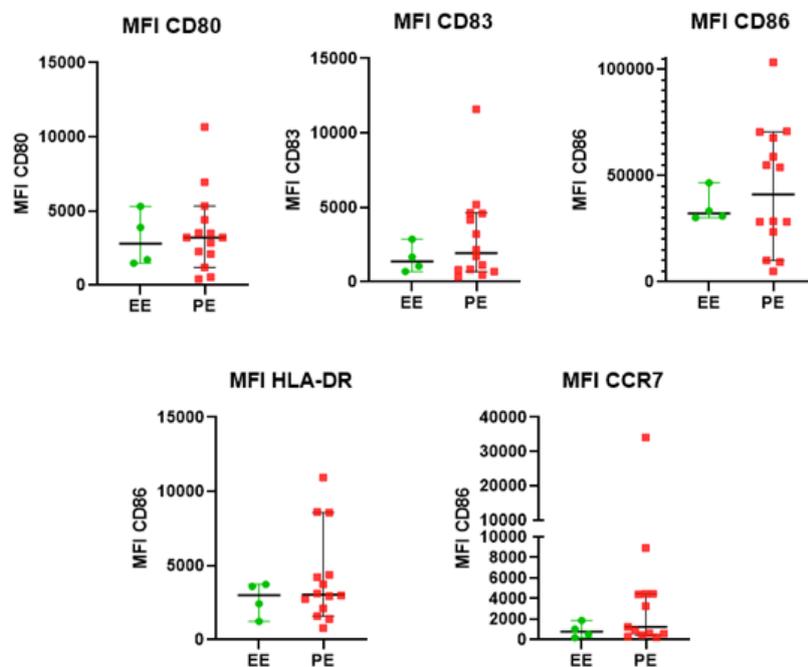


Figura R42: Fenotipo de las células dendríticas – enfermedad estable. Niveles (MFI) de los distintos marcadores de activación (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7) de las células dendríticas

presentes en la vacuna terapéutica agrupados en función de la respuesta al tratamiento. EE, enfermedad estable (verde); PE, progresión de la enfermedad (rojo).

Posteriormente, se dividió a los pacientes en 2 grupos en función de si presentaron hiperprogresión (HPD) o progresión de la enfermedad (PD). Se analizaron los niveles de los 5 marcadores, tanto en % (**figura R43**) como en MFI (**figura R44**). Solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al % de CD86, cuyos niveles fueron más altos en el grupo de HPD ($p=0,0140$).

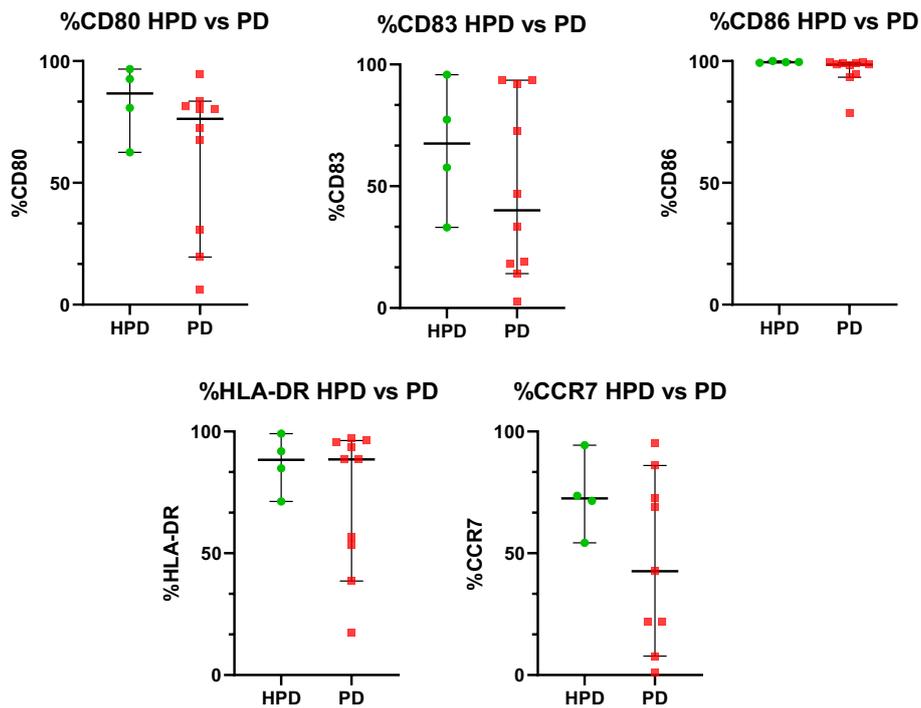


Figura R43: Fenotipo de las células dendríticas – hiperprogresión. Niveles (%) de los distintos marcadores de activación (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7) de las células dendríticas presentes en la vacuna terapéutica agrupados en función de la hiperprogresión o no. HPD, hiperprogresión (verde); PP, progresión de la enfermedad (rojo).

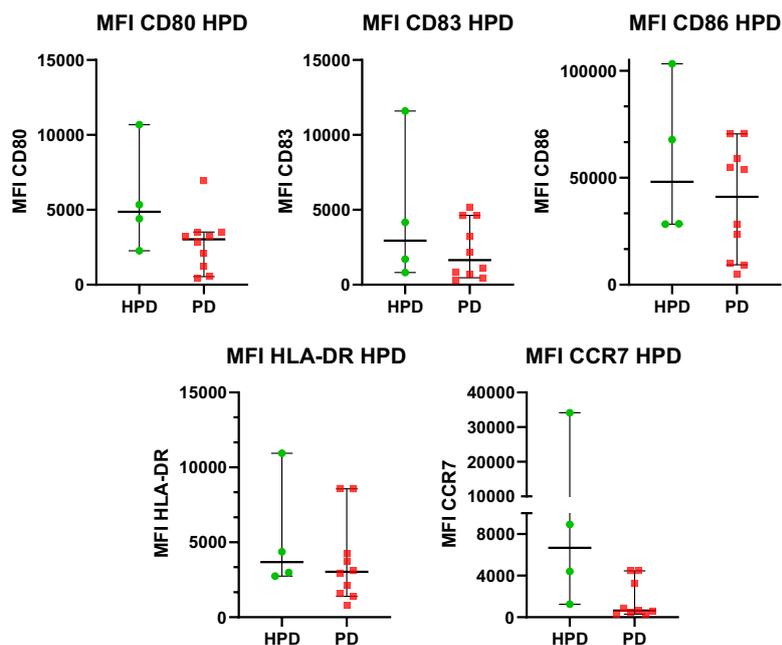


Figura R44: Fenotipo de las células dendríticas – hiperprogresión. Niveles (MFI) de los distintos marcadores de activación (CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7) de las células dendríticas presentes en la vacuna terapéutica agrupados en función de la hiperprogresión o no. HPD, hiperprogresión (verde); PP, progresión de la enfermedad (rojo).

En la **tabla R14** pueden verse los valores estadísticos de p de todos los análisis realizados.

Tabla R14. Valores estadísticos de p de los niveles de expresión de marcadores de activación en las células dendríticas de la vacuna terapéutica en los distintos subgrupos de pacientes analizados en función de enfermedad estable e hiperprogresión.

Marcador	EE vs PE (%)	EE vs PE MFI	HPD vs PD (%)	HPD vs PD (MFI)
CD80	0,8784	0,9588	0,2398	0,0647
CD83	0,8650	0,5739	0,4054	0,2238
CD86	0,3176	0,5785	0,0140	0,3014
HLA-DR	0,9431	0,5052	0,6354	0,3736
CCR7	0,2969	0,2958	0,1791	0,0503

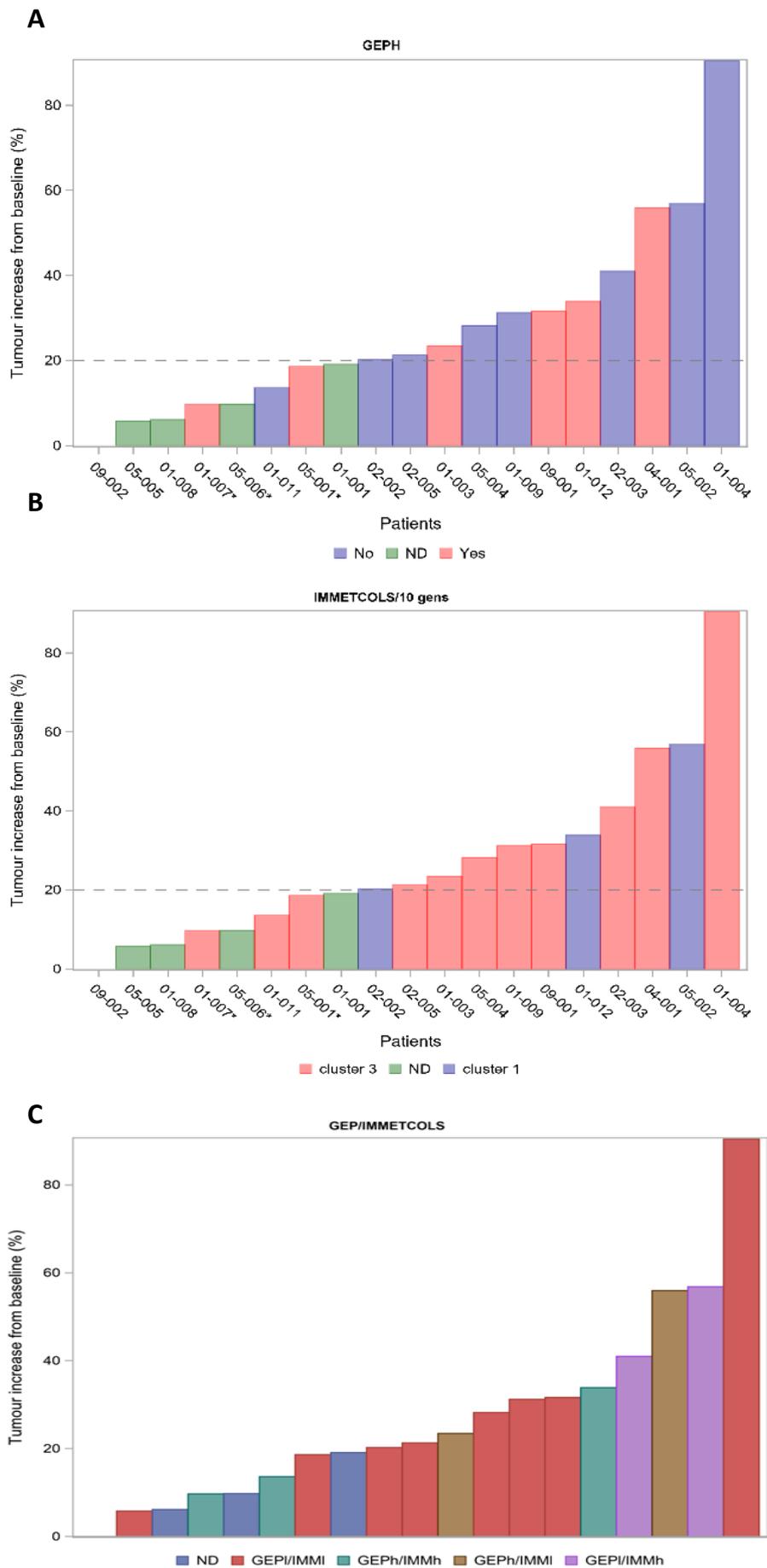
EE, enfermedad estable; PE, progresión de la enfermedad; HPD, hiperprogresión; PD, progresión.

2.5.5. RNAseq: firmas de expresión inmunitarias

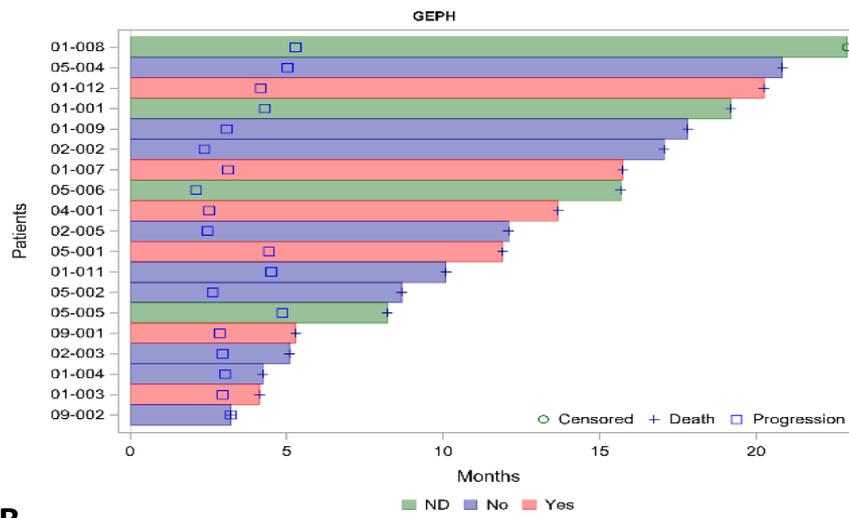
Se evaluó la asociación entre los distintos *clusters* de pacientes agrupados en función de sus firmas de expresión génica y los parámetros de respuesta clínica, PFS y OS.

En cuanto a la correlación con la respuesta clínica, en la **figura R45** puede verse la tasa de incremento tumoral en los diferentes pacientes y el *cluster* al cual se asociaron en distintos colores, tanto en función de la firma GEP (**figura R45A**) como de la firma IMMETCOLS (**figura R45B**) y la combinación de los niveles de expresión de ambos (**figura R45C**). No encontramos correlaciones significativas entre los distintos *clusters* y el incremento tumoral.

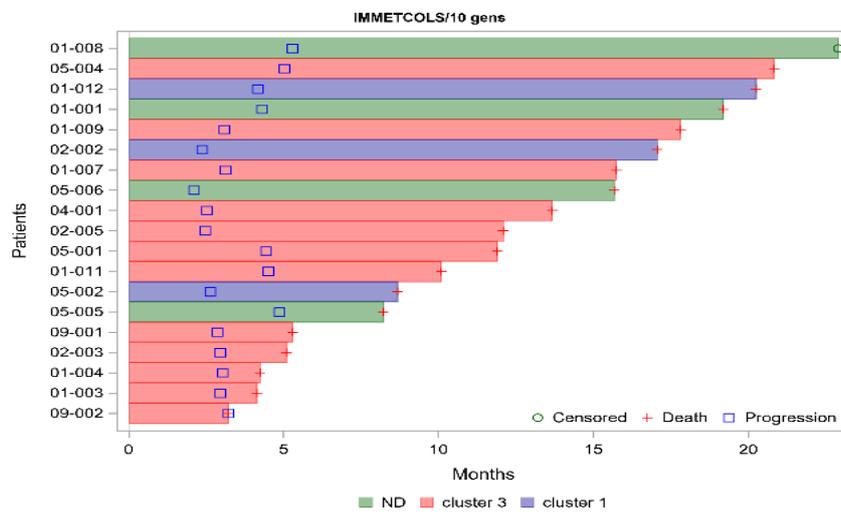
Figura R45. Correlación entre la respuesta clínica (% de incremento del tamaño tumoral con respecto al momento basal) y las diferentes firmas de expresión inmunitarias. Correlación entre respuesta clínica y firma GEP high (A); correlación entre respuesta clínica y firma IMMETCOLS (B); correlación entre respuesta clínica y combinación de ambas firmas GEP/IMMETCOLS (C). GEPH, GEP high; ND, no disponible; GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; GEPH/IMMh, GEP high-IMMETCOLS high; GEPH/IMMI, GEP high-IMMETCOLS low; GEPI/IMMh, GEP low-IMMETCOLS high (*página siguiente*).



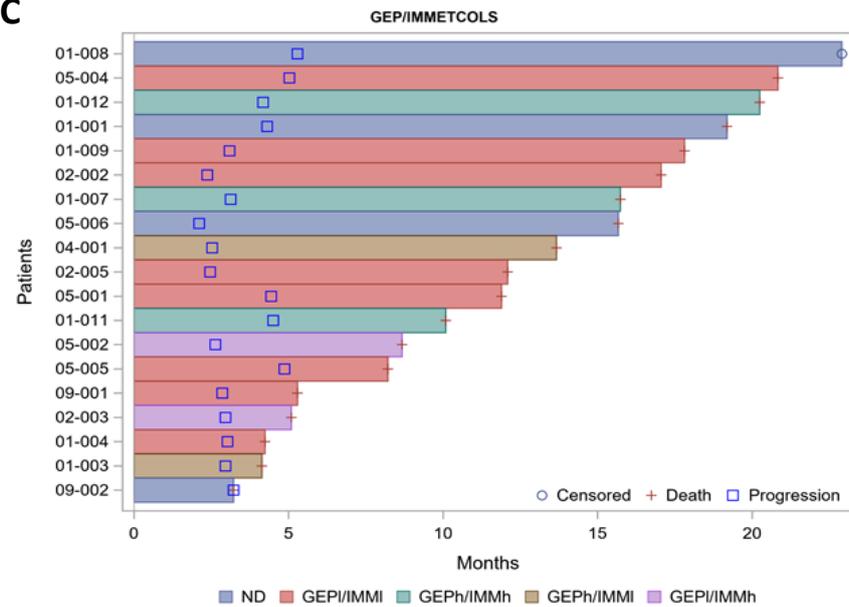
A



B



C



Resultados

Figura R46. Correlación entre la PFS y OS y las diferentes firmas de expresión inmunitarias.

Correlación entre respuesta clínica y firma GEP high (A); correlación entre respuesta clínica y firma IMMETCOLS (B); correlación entre respuesta clínica y combinación de ambas firmas GEP/IMMETCOLS (C). GEPH, GEP high; ND, no disponible; GEPI/IMMI, GEP low-IMMETCOLS low; GEPH/IMMh, GEP high-IMMETCOLS high; GEPH/IMMI, GEP high-IMMETCOLS low; GEPI/IMMh, GEP low-IMMETCOLS high (página anterior).

En cuanto a la PFS y la OS, en la **figura R46** puede verse un *swimmer plot* con la evolución de los diferentes pacientes y el *cluster* al cual se asociaron en distintos colores, tanto en función de la firma GEP (**figura R46A**), de la firma IMMETCOLS (**figura R46B**) y de la combinación de los niveles de expresión de ambos (**figura R46C**). No encontramos correlaciones significativas entre los distintos *clusters* y la PFS o la OS.

También podemos observar las diferentes gráficas de Kaplan-Meier en los distintos subgrupos de *clusters* de GEP (**figura R47A**) e IMMETCOLS (**figura R47B**).

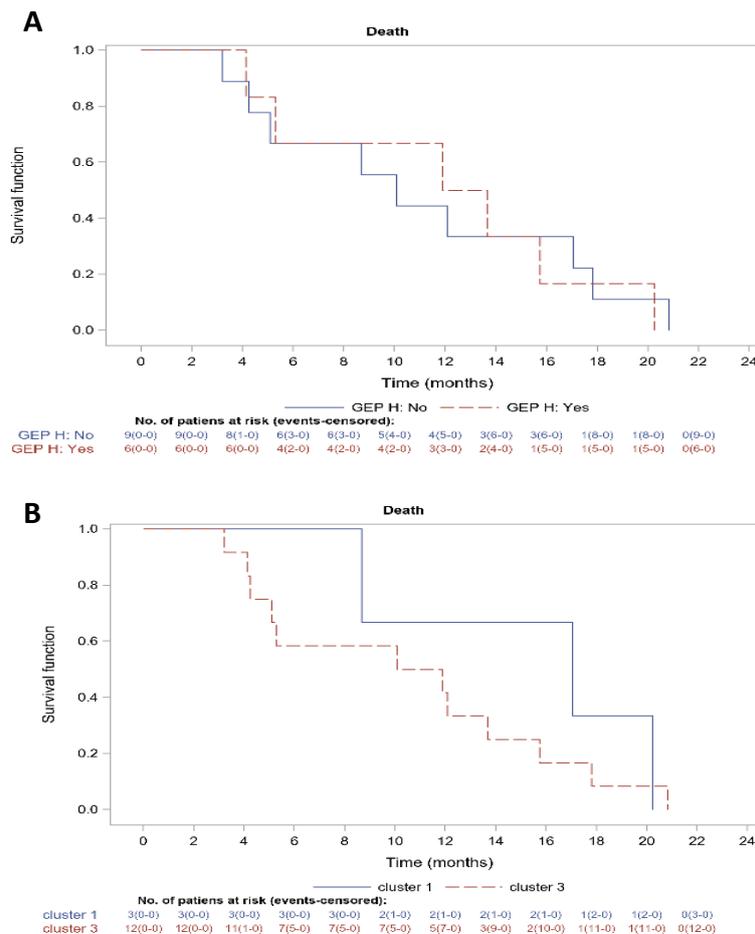


Figura R47. Curvas de Kaplan-Meier para OS con las firmas de expresión inmunitarias. A: Firma GEP high (azul) y GEP low (rojo). B: cluster 1 (azul) y cluster 3 (rojo) de IMMETCOLS.

Además, se evaluó la correlación entre la OS y la PFS entre los diferentes *clusters* de la combinación de expresión de las distintas firmas, dividiendo a los pacientes en 4 grupos: GEP_h/IMM_h, GEP_h/IMM_l, GEP_l/IMM_h y GEP_l/IMM_l. Debido a la *n* reducida que surgía al hacer esta división, también se analizó la correlación con la PFS y la OS dividiendo a los pacientes en 2 grupos: los que presentaban la firma más inmunosupresora (GEP_l/IMM_l) y los que presentaban el resto de firmas (OTROS). Como puede verse en la **figura R48**, tampoco se encontró ninguna correlación ni diferencias significativas entre los diferentes subgrupos.

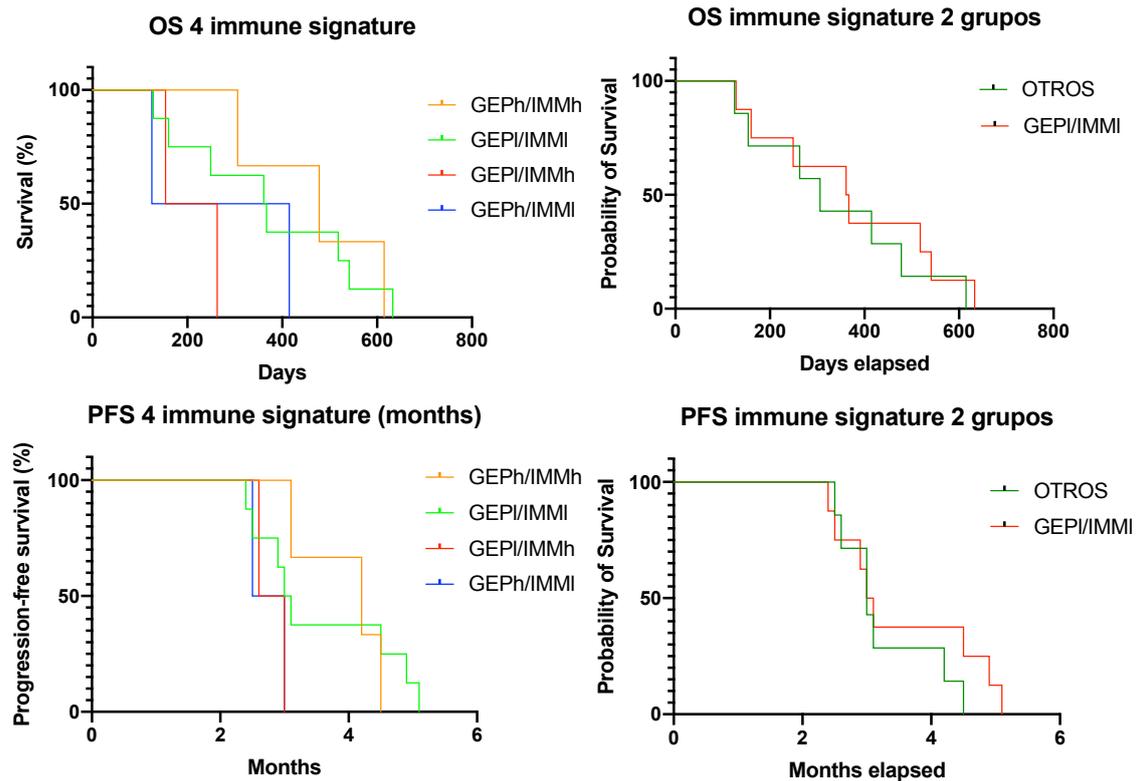


Figura R48. Curvas de Kaplan-Meier para OS y PFS con la combinación de signatures GEP e IMMTCOLS. OS, *overall survival*; PFS, *progression free survival*; GEP_h/IMM_h (naranja), GEP_h/IMM_h; GEP_l/IMM_l (verde), GEP_l/IMM_l; GEP_l/IMM_h (rojo), GEP_l/IMM_h; GEP_h/IMM_l (azul), GEP_h/IMM_l.

Por último, se analizó la diferencia en OS entre los pacientes con HPD y los que no, y como era esperable se encontraron diferencias significativas ($p=0,0006$), ya que la mediana de OS en HPD y no-HPD fue de 141 y 476 días, respectivamente (**figura R49**).

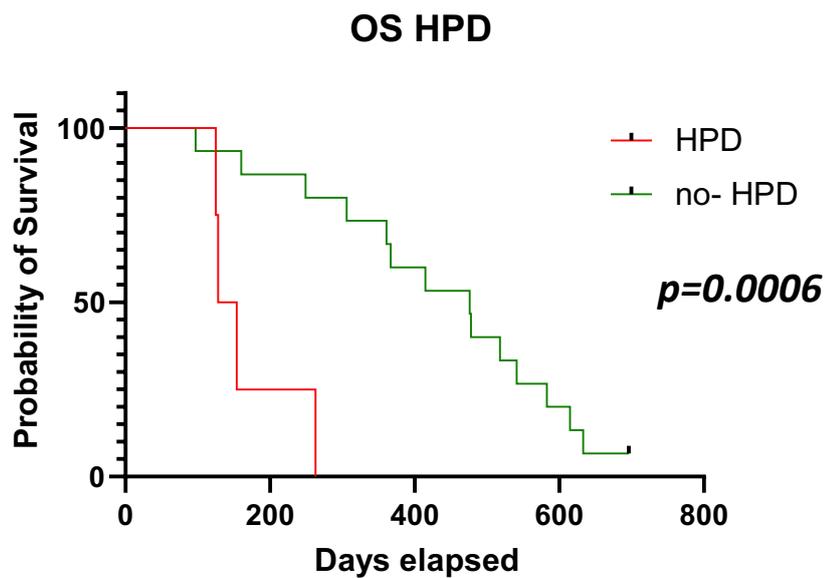


Figura R49. Curvas de Kaplan-Meier para OS (*overall survival*) en pacientes con hiperprogresión (HPD, rojo) y no hiperprogresión (no-HPD, verde).

2.5.6. Evaluación del papel del HLA

Puesto que las moléculas de HLA juegan un papel fundamental en la presentación antigénica, los distintos alelos pueden afectar a la eficacia de las células dendríticas a la hora de presentar los antígenos tumorales y desencadenar una respuesta antitumoral efectiva. Para evaluar el papel que ha podido ejercer el HLA en la eficacia de este tratamiento, tras la tipificación de los diferentes alelos de HLA clase I y clase II en todos los pacientes (**tabla R8**), en primer lugar, se comparó el número de alelos homocigotos en 3 grupos de pacientes, divididos en función de la respuesta clínica al tratamiento (HPD, PD y SD). No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en los 3 grupos, por lo que la variabilidad en cuanto a la heterocigosidad alélica no parece haber tenido influencias en la respuesta clínica a esta terapia (**figura R50**).

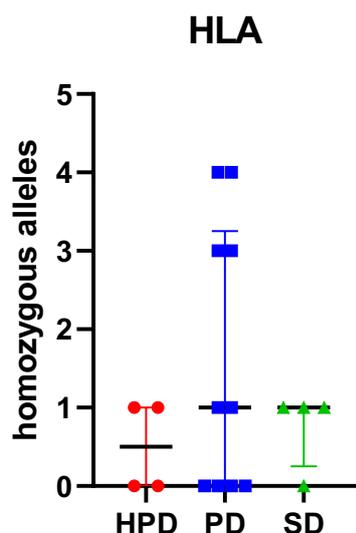


Figura R50. Número de alelos homocigotos en los distintos grupos de pacientes en función de la respuesta clínica al tratamiento. HPD, hiperprogresión; PD, progresión, SD, enfermedad estable

En segundo lugar, se analizaron las frecuencias alélicas de todos los alelos presentes en los distintos pacientes, y se compararon con la frecuencia alélica de la población general (**tabla R15**), para descartar que la población de nuestro estudio no estuviese sesgada y estos pacientes con cáncer colorrectal metastásico presentasen una frecuencia alélica muy diferente a la población sana, ya que esto podría afectar al análisis del papel del HLA en los diferentes subgrupos de pacientes evaluados. No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la frecuencia alélica de nuestra población a estudio y la población general, excepto para el alelo DQB1*03:02 ($p=0.0309$, **figura R51**).

Tabla R15. Comparación de las frecuencias alélicas de HLA de los pacientes del estudio y la frecuencia alélica de la población general.

n alelos	Población general		Población estudio	
	%	n	% alelos	
A*01:01	10,24%	6	17,65%	
A*02:01	22,23%	11	32,35%	
A*03:01	9,04%	2	5,88%	
A*11:01	5,17%	2	5,88%	
A*23:01	2,40%	2	5,88%	
A*24:02	8,67%	4	11,76%	
A*25:01	2,03%	1	2,94%	
A*29:02	7,29%	2	5,88%	
A*30:02	3,14%	1	2,94%	
A*32:01	3,41%	3	8,82%	
B*07:02	6,56%	2	5,71%	
B*08:01	5,36%	3	8,57%	
B*15:01	3,60%	1	2,86%	
B*18:01	6,47%	3	8,57%	
B*27:02	0,46%	1	2,86%	
B*27:05	3,05%	1	2,86%	
B*35:01	5,08%	2	5,71%	
B*35:03	1,57%	1	2,86%	
B*39:01	1,76%	1	2,86%	
B*40:02	1,11%	1	2,86%	
B*44:02	5,45%	4	11,43%	
B*44:03	7,86%	3	8,57%	
B*45:01	1,29%	1	2,86%	
B*49:01	3,33%	3	8,57%	
B*51:01	8,32%	4	11,43%	
B*57:01	2,50%	3	8,57%	
C*02:02	4,98%	2	5,88%	
C*03:03	3,51%	2	5,88%	
C*04:01	11,72%	3	8,82%	
C*05:01	8,21%	6	17,65%	
C*06:02	8,21%	3	8,82%	
C*07:01	10,98%	7	20,59%	
C*07:02	8,67%	3	8,82%	
C*08:02	5,63%	1	2,94%	
C*12:03	7,56%	1	2,94%	
C*15:02	2,95%	3	8,82%	
C*16:01	6,92%	3	8,82%	
DRB1*03:01	9,96%	4	11,76%	
DRB1*01:01	8,12%	3	8,82%	
DRB1*01:03	0,83%	1	2,94%	
DRB1*04:01	3,41%	1	2,94%	
DRB1*04:02	1,85%	3	8,82%	
DRB1*04:04	1,48%	2	5,88%	
DRB1*07:01	15,13%	4	11,76%	
DRB1*08:01	2,12%	2	5,88%	
DRB1*09:01	0,83%	2	5,88%	
DRB1*11:01	8,30%	2	5,88%	
DRB1*11:04	3,23%	1	2,94%	
DRB1*11:15	0,09%	1	2,94%	
DRB1*13:01	7,29%	2	5,88%	
DRB1*13:02	3,41%	1	2,94%	
DRB1*14:01	1,66%	1	2,94%	
DRB1*15:01	8,95%	2	5,88%	
DRB1*16:01	1,66%	1	2,94%	
DQB1*02:01	10,15%	5	14,71%	
DQB1*02:02	11,72%	3	8,82%	
DQB1*03:01	15,87%	4	11,76%	
DQB1*03:02	6,64%	6	17,65%	
DQB1*03:03	2,40%	2	5,88%	
DQB1*04:02	2,58%	2	5,88%	
DQB1*05:01	10,52%	4	11,76%	
DQB1*05:02	1,94%	1	2,94%	
DQB1*05:03	1,29%	1	2,94%	
DQB1*06:02	6,00%	2	5,88%	
DQB1*06:03	5,26%	2	5,88%	

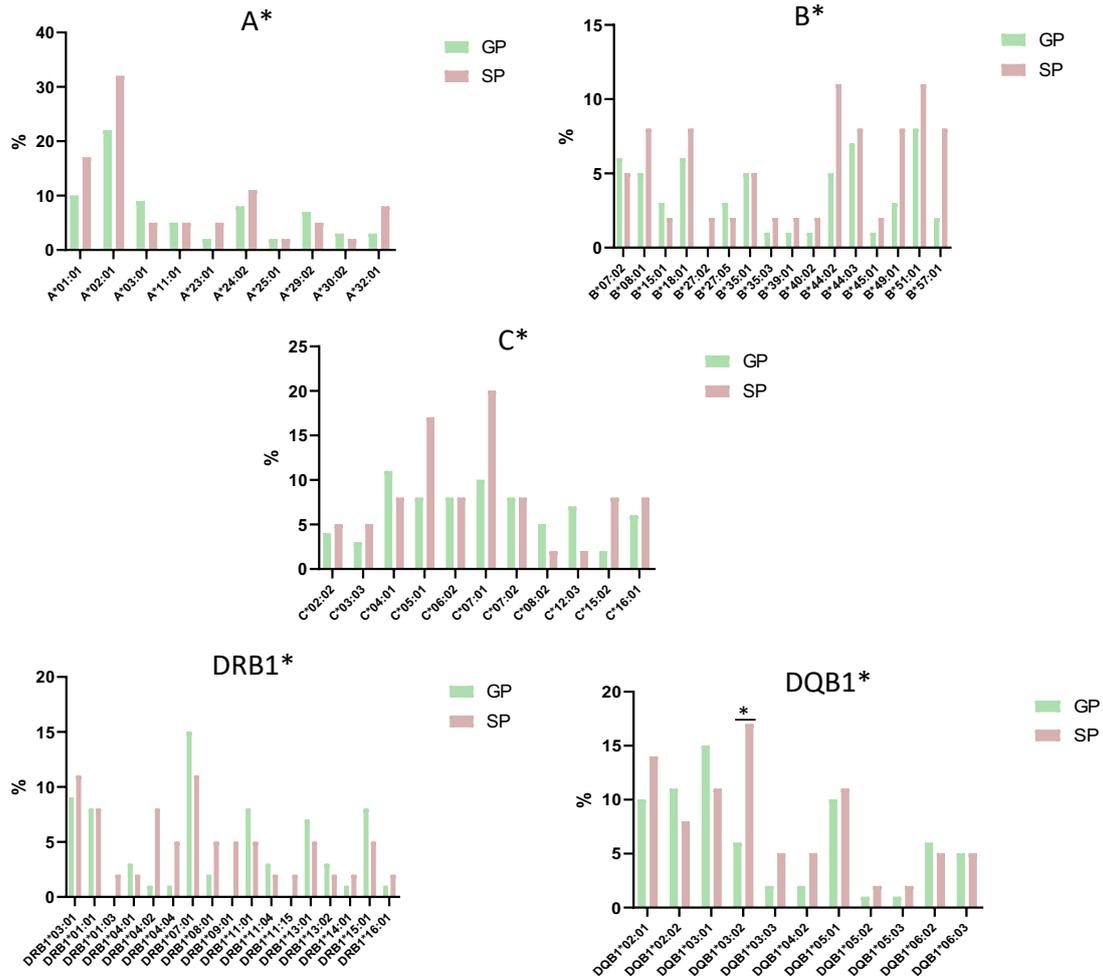


Figura R51. Frecuencias alélicas de la población sana (GP, *general population*, verde) y de los pacientes del estudio (SP, *study population*, rojo).

Una vez confirmado que los pacientes estudiados no se diferenciaban de la población general en cuanto a la frecuencia de su fenotipo HLA, dividimos de nuevo a los pacientes en 3 grupos en función de la respuesta clínica al tratamiento (HPD, PD y SD) y comparamos sus frecuencias alélicas entre ellas y con la población total estudiada, para evaluar si había algún alelo presente en mayor medida en alguno de los grupos clínicos (**Tabla R16**).

Tabla R16. Comparación de las frecuencias alélicas de HLA entre los diferentes subgrupos de respuesta clínica de los pacientes incluidos el ensayo clínico.

n alelos	Población estudio		HPD		PD		SD	
	n	% alelos	n	%	n	%	n	%
A*01:01	6	17,65%	1	14,29%	3	15,79%	2	25,00%
A*02:01	11	32,35%	4	57,14%	5	26,32%	2	25,00%
A*03:01	2	5,88%	0	0,00%	1	5,26%	1	12,50%
A*11:01	2	5,88%	0	0,00%	2	10,53%	0	0,00%
A*23:01	2	5,88%	0	0,00%	2	10,53%	0	0,00%
A*24:02	4	11,76%	1	14,29%	2	10,53%	1	12,50%
A*25:01	1	2,94%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
A*29:02	2	5,88%	0	0,00%	1	5,26%	1	12,50%
A*30:02	1	2,94%	1	14,29%	0	0,00%	0	0,00%
A*32:01	3	8,82%	0	0,00%	3	15,79%	0	0,00%
B*07:02	2	5,71%	0	0,00%	2	10,53%	0	0,00%
B*08:01	3	8,57%	1	12,50%	0	0,00%	2	25,00%
B*15:01	1	2,86%	0	0,00%	1	5,26%	0	0,00%
B*18:01	3	8,57%	2	25,00%	1	5,26%	0	0,00%
B*27:02	1	2,86%	0	0,00%	1	5,26%	0	0,00%
B*27:05	1	2,86%	0	0,00%	1	5,26%	0	0,00%
B*35:01	2	5,71%	0	0,00%	2	10,53%	0	0,00%
B*35:03	1	2,86%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
B*39:01	1	2,86%	0	0,00%	1	5,26%	0	0,00%
B*40:02	1	2,86%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
B*44:02	4	11,43%	4	50,00%	0	0,00%	0	0,00%
B*44:03	3	8,57%	0	0,00%	2	10,53%	1	12,50%
B*45:01	1	2,86%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
B*49:01	3	8,57%	0	0,00%	3	15,79%	0	0,00%
B*51:01	4	11,43%	1	12,50%	1	5,26%	2	25,00%
B*57:01	3	8,57%	0	0,00%	3	15,79%	0	0,00%
C*02:02	2	5,88%	0	0,00%	2	11,11%	0	0,00%
C*03:03	2	5,88%	0	0,00%	1	5,56%	1	12,50%
C*04:01	3	8,82%	0	0,00%	2	11,11%	1	12,50%
C*05:01	6	17,65%	6	75,00%	0	0,00%	0	0,00%
C*06:02	3	8,82%	0	0,00%	2	11,11%	1	12,50%
C*07:01	7	20,59%	1	12,50%	4	22,22%	2	25,00%
C*07:02	3	8,82%	0	0,00%	2	11,11%	1	12,50%
C*08:02	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
C*12:03	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
C*15:02	3	8,82%	1	12,50%	1	5,56%	1	12,50%
C*16:01	3	8,82%	0	0,00%	2	11,11%	1	12,50%
DRB1*03:01	4	11,76%	2	25,00%	0	0,00%	2	25,00%
DRB1*01:01	3	8,82%	0	0,00%	3	16,67%	0	0,00%
DRB1*01:03	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
DRB1*04:01	1	2,94%	1	12,50%	0	0,00%	0	0,00%
DRB1*04:02	3	8,82%	1	12,50%	2	11,11%	0	0,00%
DRB1*04:04	2	5,88%	0	0,00%	1	5,56%	1	12,50%
DRB1*07:01	4	11,76%	0	0,00%	3	16,67%	1	12,50%
DRB1*08:01	2	5,88%	1	12,50%	0	0,00%	1	12,50%
DRB1*09:01	2	5,88%	1	12,50%	0	0,00%	1	12,50%
DRB1*11:01	2	5,88%	0	0,00%	2	11,11%	0	0,00%
DRB1*11:04	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
DRB1*11:15	1	2,94%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
DRB1*13:01	2	5,88%	1	12,50%	1	5,56%	0	0,00%
DRB1*13:02	1	2,94%	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%
DRB1*14:01	1	2,94%	1	12,50%	0	0,00%	0	0,00%
DRB1*15:01	2	5,88%	0	0,00%	2	11,11%	0	0,00%
DRB1*16:01	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
DQB1*02:01	5	14,71%	2	25,00%	1	5,56%	2	25,00%
DQB1*02:02	3	8,82%	0	0,00%	2	11,11%	1	12,50%
DQB1*03:01	4	11,76%	0	0,00%	3	16,67%	1	12,50%
DQB1*03:02	6	17,65%	2	25,00%	3	16,67%	1	12,50%
DQB1*03:03	2	5,88%	1	12,50%	0	0,00%	1	12,50%
DQB1*04:02	2	5,88%	1	12,50%	0	0,00%	1	12,50%
DQB1*05:01	4	11,76%	0	0,00%	4	22,22%	0	0,00%
DQB1*05:02	1	2,94%	0	0,00%	1	5,56%	0	0,00%
DQB1*05:03	1	2,94%	1	12,50%	0	0,00%	0	0,00%
DQB1*06:02	2	5,88%	0	0,00%	2	11,11%	0	0,00%
DQB1*06:03	2	5,88%	1	12,50%	1	5,56%	0	0,00%

HPD, hiperprogresión; PD, progresión; SD, enfermedad estable.

En cuanto a los alelos A*, DRB1* y DQB1*, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los subgrupos con diferente respuesta clínica al tratamiento (figura R52).

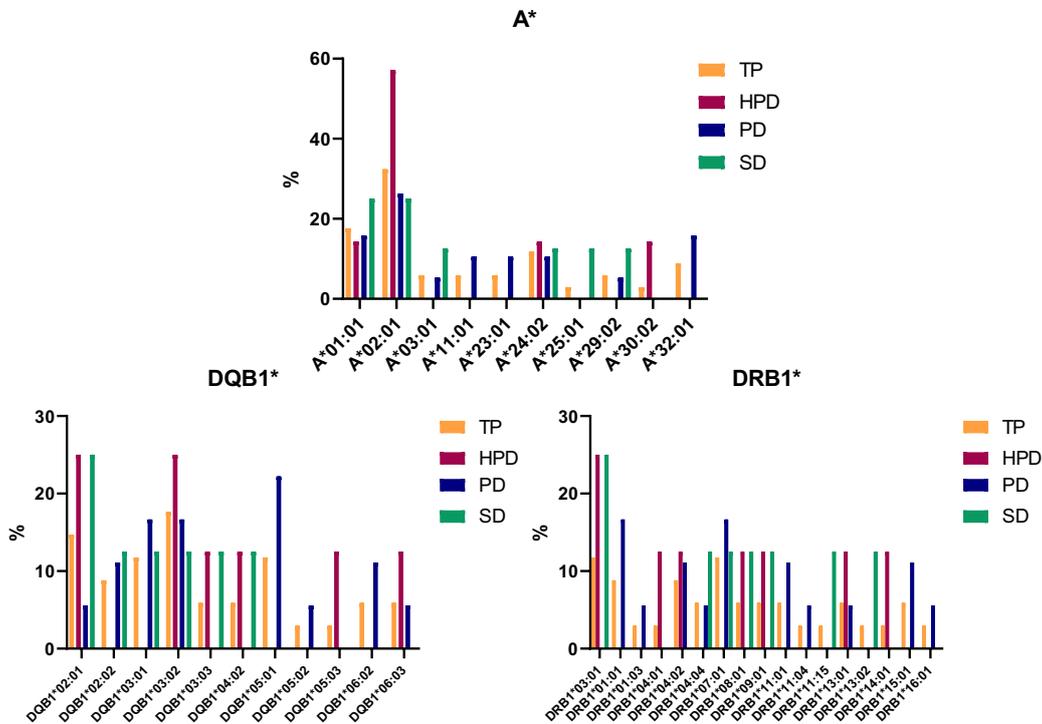


Figura R52. Subpoblaciones de pacientes en función de respuesta clínica que no mostraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia alélica del HLA (A*, DQB1* y DRB1*). TP, total population; HPD, hiperprogresión; PD, progresión; SD, enfermedad estable.

Por otro lado, sí que encontramos 3 alelos cuya frecuencia era mayor en los pacientes que había sufrido hiperprogresión de la enfermedad (HPD): B*44:02 y C*05:01. En el caso de B*44:02, estas diferencias las encontramos al comparar las frecuencias de este alelo en HPD tanto con la población total ($p=0.0279$) como al comparar HPD con PD ($p=0.0040$). Para C*05:01, las diferencias las encontramos al comparar todos los grupos: la población general frente a HPD ($p=0.0036$), HPD frente a PD ($p=0.0001$) y HPD frente a SD ($p=0.0070$). Estas diferencias pueden verse en la figura R53.

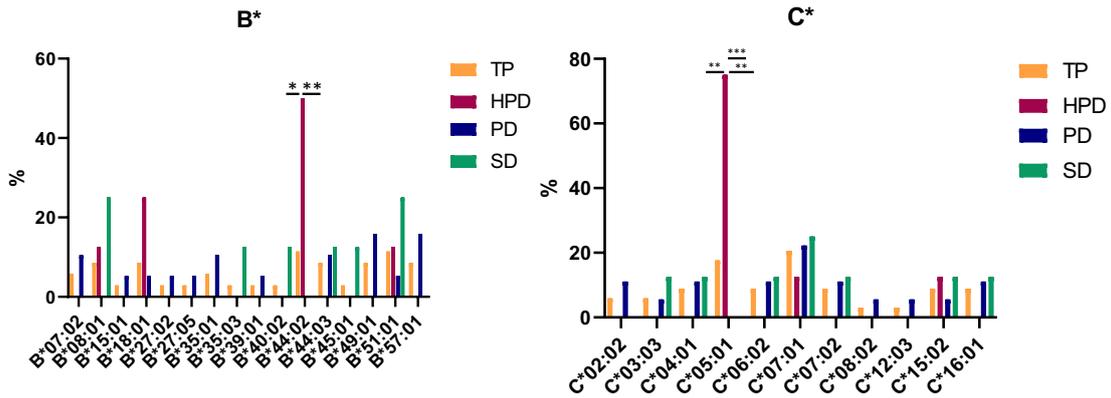


Figura R53. Subpoblaciones de pacientes en función de respuesta clínica que mostraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia alélica del HLA (B*44:02 y C*05:01). TP, total population; HPD, hiperprogresión; PD, progresión; SD, enfermedad estable.

Al observar la supervivencia global de este grupo de pacientes que tienen uno de estos alelos, se observa que la supervivencia global es claramente inferior a la de los pacientes que no la tienen, tanto para B*44:02 como C*05:01 ($p=0.0006$), **figura R54**. Así, podríamos concluir que estos dos alelos se asocian a una pobre respuesta al tratamiento, en forma de enfermedad hipreprogresiva y por tanto a una peor supervivencia.

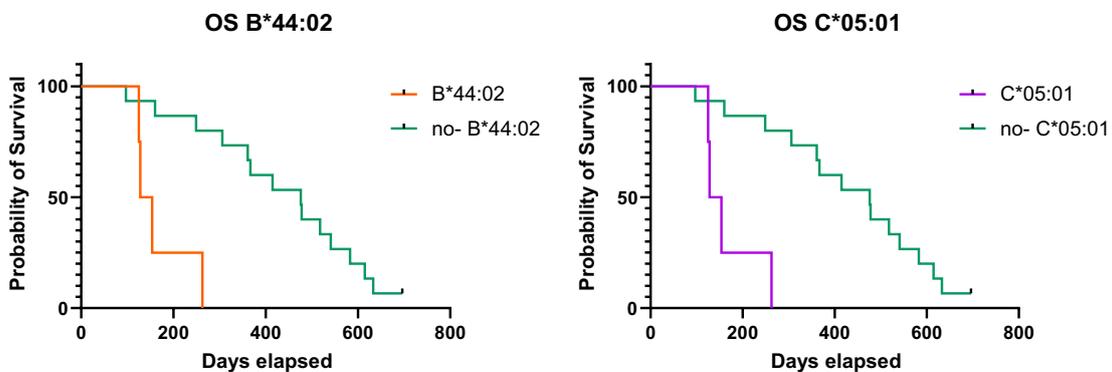


Figura R54. Supervivencia global (OS) de comparando pacientes que presentan los alelos B*44:02 o C*05:01 y los que no presentan ninguno de estos alelos.

V. Discusión

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, siendo en España el cáncer que se diagnostica con más frecuencia (342). A pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho en los últimos años para mejorar la detección precoz, en pacientes con enfermedad avanzada la mortalidad continúa siendo elevada, con una tasa de supervivencia libre de progresión al año inferior al 40% y una supervivencia global a los 5 años inferior al 5% (343). Aunque se han desarrollado nuevas terapias, la mayoría sólo son eficaces en los tumores de tipo MSI, que representan un porcentaje muy pequeño de los pacientes con este tipo de tumores. Estos datos hacen que el cáncer colorrectal se mantenga como una de las principales causas de muerte por cáncer.

Las vacunas de células dendríticas (DCs) llevan utilizándose desde hace décadas en el tratamiento de distintos tumores. Con unos resultados preclínicos muy prometedores, en su aplicación clínica han demostrado que son seguras y capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, esta potenciación del sistema inmune no ha demostrado ser suficiente para traducirse en un beneficio clínico claro, con unas tasas de respuesta objetiva inferiores al 15% (297). A pesar de estas limitaciones, gracias al desarrollo de nuevos agentes de inmunoterapia, esta opción terapéutica continúa explorándose en combinación con otros fármacos. En los últimos años, los *checkpoint inhibitors* (ICIs) han supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer, logrando remisiones en tumores hasta ahora considerados incurables, como melanoma o cáncer de pulmón avanzados (233). No obstante, en muchos tumores, especialmente en aquellos con una baja tasa de mutaciones como el de tipo colorectal MSS, han mostrado una eficacia más limitada y la mayoría de los pacientes tratados no consiguen alcanzar respuestas duraderas (234). Por este motivo, ampliar el estudio de los mecanismos de respuesta inmune antitumoral para encontrar nuevas vías de evasión tumoral es clave para diseñar terapias más efectivas, así como encontrar biomarcadores de respuesta que permitan definir mejor el grupo de pacientes que puedan beneficiarse de esta terapia.

Estos precedentes nos motivaron a plantearnos la utilización de una terapia combinada entre *checkpoints inhibitors* y vacunas de células dendríticas para el tratamiento de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico de tipo MSS, así como definir biomarcadores de respuesta a esta terapia. Para llevarlo a cabo, primero investigamos la capacidad sinérgica de esta combinación para estimular al sistema inmune mediante estudios de respuesta *in vitro*. Con la finalidad de caracterizar el microambiente tumoral del cáncer colorrectal, se analizaron muestras de pacientes con este tipo de tumor y así, poder posteriormente aplicarlo a los pacientes tratados para profundizar en los mecanismos que tienen lugar durante el desarrollo

de la respuesta inmune al tratamiento. En base a esto, se llevó a cabo la monitorización de la respuesta inmune de los pacientes tratados con esta terapia combinada en el marco de un ensayo clínico.

A continuación, desarrollaremos la discusión en base a los resultados presentados.

1. Estudios de inmunogenicidad *in vitro*

Han pasado más de 25 años desde que salieron a la luz los primeros resultados de la aplicación clínica de las vacunas de células dendríticas en humanos (360). En este primer estudio, publicado en 1996, 4 pacientes con linfoma fueron tratados con células dendríticas autólogas cargadas con proteínas tumorales por vía intravenosa. En los 4 pacientes detectaron respuesta inmune antitumoral, aunque sólo la mitad de ellos experimentaron una respuesta clínica (1 respuesta completa y 1 respuesta parcial). A partir de éste, numerosos estudios han explorado el uso terapéutico de células dendríticas, principalmente en melanoma, pero extendiéndose a numerosos tipos de tumores. Actualmente, hay 225 ensayos clínicos activos de vacunas de células dendríticas para el tratamiento del cáncer, 9 de ellos en cáncer colorrectal (datos de *clinicaltrials.gov* en marzo de 2023). Si analizamos los resultados de todos los estudios en su conjunto, a pesar de la dificultad para compararlos debido a la heterogeneidad de los mismos, podemos concluir que esta terapia es segura, con pocos efectos secundarios y capaz de generar una respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, tras décadas de aplicación clínica estas vacunas continúan sin mostrar grandes resultados clínicos (297).

La respuesta específica generada por las células dendríticas depende en gran medida de la expresión de moléculas coestimuladoras, que en el microambiente tumoral pueden estar inhibidas, lo que se traduce en una pobre estimulación de la célula dendrítica y la consecuente estimulación débil del linfocito T. Por ello, la presencia de *immune checkpoint inhibitors* (ICIs) puede suprimir los mecanismos bloqueantes que inhiben la respuesta de los linfocitos T al ser activados de manera insuficiente por las células dendríticas.

El tratamiento con ICIs ha crecido exponencialmente en los últimos años, gracias a los buenos resultados en pacientes con tumores de muy mal pronóstico, como melanoma con cáncer de pulmón avanzado (234), lo cual ha llevado a la aprobación de estos fármacos en un amplio repertorio de cánceres. Si nos fijamos en los ensayos clínicos activos con este tipo de fármacos, actualmente encontramos más de 1500 para el tratamiento de distintos tumores a lo largo de todo el mundo, de los cuales 105 son en cáncer colorrectal (datos de

clinicaltrials.gov en marzo de 2023, **figura D1**), lo cual indica que las aplicaciones de esta terapia siguen desarrollándose con un amplio crecimiento. Sin embargo, esta alternativa terapéutica todavía cuenta con muchas limitaciones, ya que se ha observado un alto porcentaje de pacientes refractarios tanto de manera primaria como secundaria. Esta refractariedad, junto con los nada desdeñables efectos tóxicos, dificultan su aplicación en un gran número de pacientes.

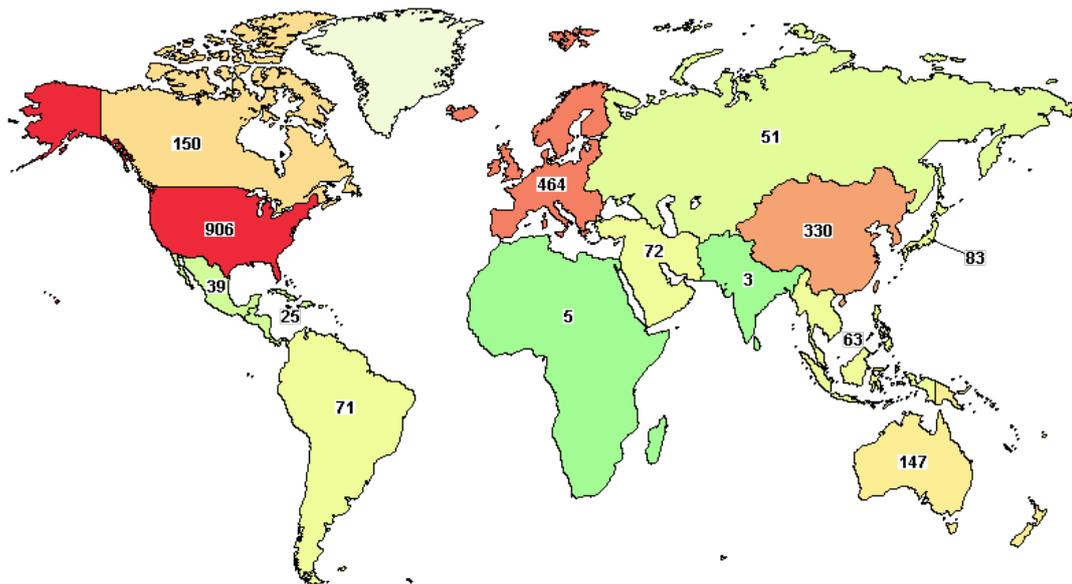


Figura D1. Ensayos clínicos activos con *immune checkpoint inhibitors* en el tratamiento del cáncer (marzo de 2023).

En diversos modelos murinos preclínicos se ha observado que distintos tipos de vacunas y bloqueantes de la vía PDL/PDL1 controlaban el crecimiento del tumor (257,361). A pesar de los resultados prometedores, hay que tener en cuenta que en dichos modelos los tumores estudiados tenían una tasa de mutaciones más elevada que la que podemos encontrar en los pacientes con tumores de tipo MSS (362).

En vista del potencial y de las limitaciones clínicas de las vacunas con células dendríticas y de los ICIs en distintos tipos de tumores, especialmente en aquellos con una baja tasa de mutaciones, nos planteamos el desarrollo de una terapia combinada que pudiera sortear estos inconvenientes.

Para poder evaluar el potencial efecto sinérgico de esta terapia combinada, se analizaron la capacidad de proliferación, así como de producción de citocinas, de linfocitos T co-cultivados con células dendríticas alogénicas cargadas con distintos péptidos tumorales, en presencia o

ausencia de un inhibidor de PD-L1 para evaluar la inmunogenicidad de la combinación. Estos experimentos de co-cultivo mostraron que la proliferación y secreción de INF- γ de los linfocitos T se incrementaba en presencia del inhibidor de PD-L1, en comparación con las células dendríticas solas. Estos buenos resultados obtenidos en los estudios *in vitro* de respuesta alogénica confirman la hipótesis del potencial efecto sinérgico que los inhibidores de la vía PD-L1 pueden ejercer sobre las células dendríticas, lo cual nos motivó a seguir investigando la posible aplicación clínica de esta combinación.

2. Caracterización del microambiente tumoral en pacientes con CCR

Una vez demostrado el potencial terapéutico de la combinación entre las vacunas de células dendríticas y los inhibidores de la vía PD-1/PD-L1, nos planteamos aplicar esta terapia en el cáncer colorrectal avanzado.

El cáncer colorrectal continua siendo uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial y uno de los principales causantes de la mortalidad por cáncer (342). Su incidencia ha ido en aumento en los últimos años y a pesar de los avances en las técnicas y programas de detección precoz, así como en el desarrollo de nuevos tratamientos (actualmente hay más de 1200 ensayos clínicos activos para el tratamiento del cáncer colorrectal), la mayoría de los pacientes recaen y las tasas de supervivencia a largo plazo son inferiores al 10%, situando este tumor el segundo puesto en cuanto a tasa de mortalidad tumoral.

Para poder diseñar terapias efectivas, así como para encontrar biomarcadores de respuesta al tratamiento, es importante caracterizar en detalle el microambiente tumoral y así conocer los procesos implicados en el desarrollo de la enfermedad y los mecanismos de resistencia a la terapia. De cara a la posterior monitorización de los pacientes tratados con esta terapia combinada, así como para entender mejor la respuesta inmune que se desarrolla en los pacientes con cáncer colorrectal, nos propusimos caracterizar las células tumorales y del sistema inmune de pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

Con el fin de llevar a cabo esta caracterización del cáncer colorrectal, se obtuvieron muestras de pacientes recién diagnosticados de cáncer colorrectal metastásico y posteriormente en aquellos que hubieran recaído al tratamiento recibido. Las muestras analizadas fueron biopsias tumorales obtenidas mediante endoscopia y sangre periférica. Con las biopsias tumorales se pretendía describir tanto el sistema inmune de los pacientes como las células tumorales. Para ello, se aislaron linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y células tumorales para generar líneas celulares. De esta forma, dispondríamos por un lado de células

del sistema inmune presentes en el tumor, para caracterizar el tipo de respuesta inmune que se desarrolla en el microambiente tumoral; y por otro de líneas tumorales que nos permitirían hacer ensayos para diseñar terapias más eficaces, así como disponer de una fuente de antígenos tumorales definida candidata a utilizarse como fuente para sensibilizar células dendríticas utilizadas como vacuna terapéutica, ya que se trata de una fuente de antígenos homogénea para el desarrollo de un ensayo clínico.

Nuestra tasa de éxito en cuanto a la generación de TILs y líneas tumorales fue muy desigual: mientras que conseguimos generar y criopreservar TILs en 38/42 biopsias procesadas (90%), sólo conseguimos generar líneas tumorales en 5/42 biopsias (12%). Esta dificultad en la generación de líneas celulares a partir de muestras tumorales ya se ha reportado para el cáncer colorrectal (363–366), a diferencia de otros tumores como melanoma en los cuales la generación de líneas tumorales es más eficiente. Este hecho nos llevó a un cambio de planteamiento e intentar generar organoides, estructuras en 3D más representativas de la complejidad y la heterogenicidad del cáncer colorrectal. Se intentaron generar organoides a partir de 6 biopsias tumorales, consiguiéndolo en un caso (17%).

El siguiente paso fue la caracterización de las células generadas, ya que el microambiente tumoral es un factor clave en la respuesta a las distintas terapias, así como en la capacidad de proliferación e invasión del tumor. El análisis de los TILs obtenidos reveló un fenotipo con predominio de la población de CD4 con respecto a la CD8 (92 vs 6%). Este aumento del ratio CD4/CD8 ya se ha descrito en este tipo de tumores (367). El nivel de expresión encontrado de marcadores de *exhaustion* como PD-1 y CTLA-4 fue similar tanto en CD4 como en CD8, siendo menor al 2%. Por último, el análisis de la expresión intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ reflejaron un fenotipo de los linfocitos de tipo Th1, que se asocia a mejor pronóstico en este y otros tumores (368).

La mayoría de los estudios de microambiente tumoral en CCR se centran en la presencia del infiltrado de linfocitos CD8 (369). Otros estudios en pacientes con CCR han reportado una disminución del fenotipo Th1, a expensas del incremento de Th2, con aumento del compartimento de linfocitos Treg, especialmente en aquellos pacientes con metástasis hepáticas (370). Los análisis que hacen en el resto de estudios se llevan a cabo directamente con RNA, no con células viables extraídas del tumor. La gran mayoría de estudios que analizan el microambiente tumoral en el CCR lo hacen directamente en el tejido, con análisis inmunohistoquímico de cortes tumorales, o bien mediante análisis de expresión de RNA también extraído directamente de la muestra tumoral. Estas diferencias en cuanto al material

de partida de análisis y el posible *bias* que se genera en la expansión celular de linfocitos T aislados hacen difícil comparar los distintos estudios con los nuestros.

Es posible que este fenotipo pueda verse afectado por las condiciones del cultivo celular de expansión al que fueron sometidos los TILs y no reflejar fielmente el fenotipo de los linfocitos presentes en el microambiente tumoral. A pesar de esta limitación, el tamaño reducido de la biopsia hizo necesario mantener y expandir las células durante un tiempo y permanecer en cultivo hasta obtener un número suficiente para poder ser analizadas.

Pese a la baja tasa de éxito en cuanto a la generación de líneas tumorales, éstas también fueron caracterizadas. En vista de la dificultad para generar estas líneas tumorales, se llevó a cabo un análisis de DNA para comprobar la presencia de mutaciones características del cáncer colorrectal. Lamentablemente, sólo detectamos mutaciones en 1 de las líneas analizadas, lo cual nos llevó a descartar las otras inicialmente identificadas como líneas tumorales, ya que carecer de estas mutaciones las excluía de considerarse células tumorales.

En cuanto a la sangre periférica obtenida, hemos sido capaces de generar células dendríticas autólogas a partir de sangre periférica en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Estos datos están en línea con estudios anteriores en los cuales se utilizaron vacunas de células dendríticas para el tratamiento de estos tumores.

A pesar de no haber podido llevar a cabo una caracterización celular más profunda, hasta la fecha hay pocos estudios que desarrollen un análisis celular del microambiente tumoral en cáncer colorrectal, centrándose en su mayoría en los tumores de tipo MSI. Si nos fijamos en los últimos 10 años, tan solo 9 estudios analizan el fenotipo de los TILs (371–379), asociándolos en algunos casos con el pronóstico de la enfermedad. Estos estudios se centran en su mayoría en el análisis de RNA y no en el fenotipo de células vivas. Es por esto que nuestros datos aportan información adicional en estos tumores poco estudiados, que puede resultar relevante a la hora de diseñar nuevos tratamientos o seleccionar mejor a los pacientes candidatos a dichas terapias.

Todos estos resultados nos llevan a afirmar que es factible la generación de TILs a partir de biopsias tumorales en la gran mayoría de los pacientes con cáncer colorrectal. Por otro lado, la obtención de líneas tumorales a partir de biopsias es posible, aunque más limitada, en este grupo de pacientes. La obtención de células dendríticas autólogas a partir de sangre periférica también es posible en estos pacientes. En conjunto, estos datos sostienen la posibilidad de llevar a cabo un ensayo clínico del tratamiento con inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 junto con

células dendríticas del cáncer colorrectal avanzado, así como de monitorizar la respuesta al tratamiento y caracterizar la interacción entre el sistema inmune y las células tumorales.

3. Ensayo clínico:

Uno de los objetivos principales de esta tesis era profundizar en los mecanismos implicados en el desarrollo de la respuesta inmune en pacientes con cáncer colorrectal de tipo MSS. Por ello, tras haber demostrado la viabilidad de llevar a cabo un ensayo clínico con esta terapia combinada, mediante los experimentos *in vitro* mencionados previamente, el siguiente paso consistió en monitorizar la respuesta inmune de los pacientes participantes en el ensayo.

Específicamente, buscamos aumentar el conocimiento sobre las interacciones entre las células del sistema inmune y el microambiente tumoral en el CCR metastásico (CCRM), de manera que podamos encontrar biomarcadores de respuesta a este tratamiento y entender las respuestas clínicas o ausencia de éstas.

Ya se han discutido las limitaciones tanto de las vacunas de células dendríticas como de los *checkpoint inhibitors*. Por tanto, resulta crucial encontrar nuevas alternativas que mejoren la eficacia clínica y superen estas limitaciones. Hasta la fecha, no hay ningún estudio publicado que explore la combinación de vacunas de células dendríticas con inhibidores de PD-L1 en pacientes con CCR de tipo MSS, por lo que se trata de los primeros estudios que exploran esta combinación de DCs junto con avelumab en el contexto de un ensayo clínico.

Los resultados de eficacia clínica de este ensayo muestran unos datos más desalentadores de lo esperado, con una media de PFS de 105 días, similares a los ya publicados en estudios que usan este tipo de terapias en pacientes con CCR de tipo MSS, como el caso de la vacuna GVAX (células tumorales modificadas genéticamente que secretan GM-CSF) en combinación con pembrolizumab (380), avelumab con cetuximab (estudio CAVE) (381), o avelumab con regorabenib (estudio REGOMUNE) (382). A pesar de no ser respuestas clínicas espectaculares, la supervivencia global conseguida en nuestro ensayo fue de 12,2 meses. Estos datos son mejores que otros publicados si los comparamos con otros ensayos en pacientes con CCR metastásico de tipo MSS: los que usan bloqueantes de PD-1 en monoterapia muestran una OS de sólo 5 meses (256), mientras que el uso de avelumab en combinación con otros fármacos ya aprobados tienen una OS de 10-11 meses (381,382).

Debido a no lograr incrementar la PFS a un 40% a los 6 meses, el reclutamiento de los pacientes fue menor al previsto como consecuencia del cierre prematuro del ensayo, con sólo

18 pacientes evaluables. Esta reducción en el número de pacientes se tradujo en una limitación a la hora de analizar los distintos parámetros monitorizados y poder sacar conclusiones de manera consistente para definir biomarcadores de respuesta.

En cuanto a la caracterización del microambiente tumoral en estos pacientes, resulta sorprendente la baja tasa de éxito en relación a la generación de TILs (sólo en 2 muestras, un 11%) si lo comparamos con el éxito demostrado en las muestras procedentes de pre-clínica (se consiguieron TILs en el 92% de las muestras). En cambio, se lograron generar líneas celulares en un 42% de las muestras procesadas, una tasa más del doble superior que la conseguida con las muestras de pre-clínica (20%). Una posible explicación a esta disparidad podría ser la cantidad limitada de las muestras procedentes de las biopsias del ensayo, ya que por un lado se priorizaba la mayor parte de la misma a la generación del lisado para la vacuna terapéutica y para las tinciones anatomopatológicas, y por otro lado el tamaño de las biopsias era menor, ya que gran parte de ellas se obtuvieron por punción ecográfica. Sin embargo, las biopsias de pre-clínica se obtuvieron mediante colonoscopia y gran cantidad de la muestra (unos 4 cilindros) se utilizaban para los estudios de cultivos celulares. Debido al bajo número de pacientes en los que se disponía de muestras celulares, añadido a la pobre respuesta clínica, no se pudo estudiar si existía una correlación entre la respuesta al tratamiento y las distintas poblaciones celulares.

En cuanto a la identificación de biomarcadores, se han podido estudiar 5 grupos de parámetros: citocinas en suero, capacidad de las DCs para inducir la proliferación T-específica, subpoblaciones de PBMCs en sangre periférica, fenotipo de las DCs administradas en la vacuna, firmas de expresión de génica inmuno-metabólicas y evaluación del papel del HLA.

De las 16 citocinas estudiadas en el suero de los pacientes evaluables, conseguimos detectar su presencia en 8, lo cual recuerda la dificultad para detectar en la periferia algunos componentes de la respuesta inmune que tienen lugar en sitios localizados. A penas existen estudios consistentes del uso de citocinas en suero como bioamarcadores de respuesta a inmunoterapia anti-tumoral. La mayoría de los estudios se centran en el uso de citocinas como biomarcadores de toxicidad, no de respuesta al tratamiento, especialmente en terapia con ICIs que inducen un mayor y más variado rango de efectos adversos (383,384).

En el caso del CCR, encontramos un estudio con DCs que mostró un incremento mayor en los niveles de citocinas proinflamatorias GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2, e IL-5 en los pacientes que alcanzaron enfermedad estable, aunque la n era muy reducida (4 pacientes de los 14

incluidos), por lo que los datos son limitados (385). En nuestro caso, los niveles de las diversas citocinas analizadas no nos sirvieron para discriminar pacientes con mayor o menor supervivencia. Aunque encontramos diferencias significativas en los distintos niveles pre y post-tratamiento, y en los diferentes subgrupos analizados, los resultados fueron muy dispares y varios no consistentes con la respuesta inmune esperada tras el tratamiento. Sin embargo, sí que encontramos niveles mayores SDF1a y menores de MMP-9 en pacientes con enfermedad estable (en comparación con los pacientes que progresaron), con lo que estas citocinas podríamos considerarlas candidatas indicativas de respuesta al tratamiento.

También cabe destacar que el único paciente que mostró una larga supervivencia (de más de 2 años) experimentó un incremento de >240 veces en los niveles de RANTES, una potente quimiocina. Aunque no podemos sustentarlo con una n más extensa (ningún otro paciente mostró tan buena respuesta clínica), debemos considerarla en futuros ensayos como candidata a biomarcador de buena respuesta.

Los estudios de proliferación linfocitaria se han utilizado en numerosas ocasiones como forma estudiar la capacidad de generación de linfocitos T específicos, en este caso anti-tumorales (386–389). En los pacientes analizados de nuestro estudio, los resultados fueron variables, ya que vimos un incremento de proliferación de estos linfocitos tras haber recibido el tratamiento sólo en algunos de los pacientes, además de no observar una correlación entre esta proliferación y la respuesta clínica. También observamos variabilidad en cuando al efecto sinérgico de la terapia combinada, en comparación con cada una de las terapias por separado. Esta inconsistencia de resultados podría explicarse debido a la baja n de pacientes que pudimos estudiar, lo que dificulta analizarlos de manera robusta. Lo que sí podemos afirmar es que la capacidad de producción de IFN γ de estos linfocitos fue mucho mayor tras el tratamiento, indicando que sí se produjo una activación del sistema inmune tras recibir la terapia. Otros estudios con DCs, aunque han demostrado la capacidad de generar estos linfocitos T específicos, de nuevo fallan a la hora de demostrar que esta respuesta *in vitro* se correlaciona con la respuesta clínica (389).

El fenotipo de las células dendríticas administradas puede jugar un papel importante en la eficacia de la vacuna, ya que el grado de maduración de las DCs tendrá impacto en su capacidad para activar a los linfocitos T y generar una respuesta anti-tumoral efectiva. En nuestro caso, no encontramos diferencias en cuanto al fenotipo de DCs administradas y la respuesta clínica, pero hemos de tener en cuenta que todas las vacunas preparadas mostraron un cierto grado de heterogeneidad en el estado madurativo, excepto para CD86 que en todos

los casos fue >75%. De nuevo, la limitación del reducido número de pacientes analizables y la notable variabilidad entre ellos dificultaron la identificación de biomarcadores de respuesta.

En relación al análisis de RNAseq, los pacientes fueron agrupados en tres clusters de la firma inmuno-metabólicas IMMETCOLS, cada una asociada a un microambiente tumoral diferente. Se realizó una comparación entre los perfiles antes del tratamiento y en el día 56 del tratamiento para observar los cambios en el microambiente tumoral después del tratamiento, sin embargo, solo se observaron cambios en algunos pacientes. Posteriormente, se intentó establecer una asociación entre estas firmas inmuno-metabólicas y la respuesta clínica de los pacientes en el ensayo, pero no se encontró una correlación entre el grado de respuesta y la ubicación específica en un *cluster* de inmuno-metabolismo. Resulta sorprendente que haya un paciente con hiperprogresión en el *cluster* 3, que es un fenotipo caracterizado por infiltración de tipo M1. En cuanto a la otra firma estudiada, GEP, el tratamiento tampoco mostró capacidad para mejorar el microambiente tumoral hacia uno más inmunogénico (GEPhigh).

No obstante, en el análisis de las muestras de metástasis hepáticas, observamos una acusada disminución en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos, al comparar las muestras antes y después del tratamiento. Dichos genes se han relacionado previamente con el desarrollo de metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal (390,391), lo que nos lleva a pensar que los cambios observados en las diferentes firmas de expresión pueden correlacionarse con la clínica de la enfermedad. Además, algunos de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y la inflamación que mostraron una disminución en su expresión tras el tratamiento desempeñan un importante papel en el control tumoral, en la inmunomodulación y en la protección del estrés oxidativo (392–395) (lo que indica que la terapia produce un entorno más favorable para la erradicación tumoral pero las células tumorales cuentan con mecanismos adicionales para escapar a estos procesos de control inmune). Esta transformación metabólica ha sido descrita en pre-clínica (396), pero no en el caso del tratamiento del cáncer colorrectal con anti-PD-L1 y DCs, lo que plantea una nueva vía de tratamiento en este ámbito.

Dado el importante papel que desempeñan las moléculas de HLA en la respuesta inmune, especialmente en la presentación de antígenos tumorales, se ha planteado que la variabilidad de los alelos HLA puede afectar a la respuesta de diversos agentes inmunoterápicos contra el cáncer, aunque la evidencia entre la asociación del HLA y la respuesta a distintos tratamientos es limitada (397,398). La mayoría de los estudios que relacionan HLA con respuesta a tratamiento anti-tumoral se centran en los problemas de expresión o pérdida de moléculas

HLA, disminuyendo o impidiendo el acceso a los antígenos tumorales para ser presentados (399).

Hasta la fecha, el estudio más amplio de este tipo de biomarcadores de HLA analizó una cohorte de más de 3000 pacientes procedentes de 8 ensayos clínicos. En dichos ensayos se utilizaban diferentes ICIs (anti-PD-1, PD-L1 y CTLA-4) para tratar distintos tipos de tumores. Tras el análisis de las distintas cohortes encontraron que el alelo A*03 se asociaba a peor OS y PFS en diversos tumores avanzados (400).

En nuestro caso, encontramos 2 alelos que se relacionaban con el desarrollo de hiperprogresión tumoral (B*44:02 y C*05:01), lo que se tradujo también en una peor supervivencia global en comparación con el resto de pacientes que no expresaban estos alelos. A pesar de la limitada cohorte, que requiere una validación más amplia, estos biomarcadores suponen la primera evidencia de asociación entre alelos HLA y la hiperprogresión en cáncer colorrectal tratado con ICIs y vacunas de DCs.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios, junto con los hallazgos en otros estudios previamente publicados, corroboran que, a pesar de los esfuerzos para intensificar la búsqueda de biomarcadores adecuados en el tratamiento de inmunoterapia antitumoral, todavía no se han descubierto aquellos con un poder de discriminación suficiente. Esto nos impulsa a seguir buscando biomarcadores más sensibles y específicos que puedan ser implementados en la práctica clínica diaria.

En este trabajo nos encontramos con varias limitaciones: el bajo número de pacientes reclutados y analizados, que dificulta encontrar biomarcadores al analizar los diferentes subgrupos en función de su respuesta al tratamiento; la utilización de un lisado tumoral como fuente de antígenos para la elaboración de la vacuna, ya que se trata de un material muy heterogéneo en comparación con los péptidos sintéticos definidos o los neoantígenos; la falta en la mejora de la PFS que contrasta con una mayor OS observada, posiblemente debido a las limitaciones de los criterios RECIST1.1 a la hora de evaluar la respuesta a la inmunoterapia; la gran variabilidad entre los parámetros candidatos utilizados como marcadores de la respuesta inmune; la falta de buenas respuestas clínicas, que dificulta dividir a los pacientes en grupos comparables y encontrar biomarcadores de respuesta al tratamiento.

Si bien los resultados obtenidos *in vitro* indican que es factible llevar a cabo una terapia combinada con DCs e ICIs en CCR aumentando la inmunogenicidad de las DCs, el ensayo clínico no logró replicar estos hallazgos, posiblemente debido a limitaciones en el diseño del ensayo o

a la necesidad de realizar estudios adicionales más amplios. En su conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran unos mecanismos inmunitarios antitumorales en el cáncer colorectal MSS más complejos de lo esperado.

Hemos visto pocas diferencias a nivel *in vitro* que podamos correlacionar con las respuestas clínicas a nivel *in vivo*. Se ha observado que la terapia combinada es capaz de estimular al sistema inmune de los pacientes, pero sigue sin ser suficiente para lograr erradicar la enfermedad, lo cual pone de manifiesto que las interacciones entre las células tumorales y el sistema inmune son más complicadas. Esto hace necesario seguir estudiando el microambiente tumoral de los tumores MSS, con menos carga mutacional, para encontrar biomarcadores que nos permitan diseñar terapias más efectivas transformando estos tumores en *hot tumours* y mejorar la supervivencia y calidad de vida de este tipo de pacientes.

A pesar de las respuestas clínicas todavía insuficientes de las DCs, esta terapia celular ha demostrado su capacidad para activar los linfocitos T antitumorales. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones más profundas sobre los mecanismos de resistencia antitumoral. Además, es importante destacar que el cáncer colorrectal de tipo MSS ha sido mucho menos explorado en comparación con el tipo MSI. En base a los resultados clínicos y los datos de subpoblaciones linfocitarias y de enzimas en suero, parece que esta terapia combinada no es suficiente para estimular al sistema inmune de manera potente.

VI. Conclusiones

1. La combinación de DCs y anti-PDL1 han demostrado capacidad para estimular de manera sinérgica a los linfocitos T en los experimentos realizados *in vitro*, como sistema de evaluar la inmunogenicidad de la combinación.
2. La combinación de DCs y anti-PDL1 han demostrado capacidad para estimular al sistema inmune *in vitro*, en pacientes con CCRm de manera específica contra un lisado del tumor.
3. Se han generado TILs y líneas tumorales a partir de biopsias de cáncer colorrectal, obtenidas mediante endoscopia o punción ecográfica.
4. Se ha logrado caracterizar el fenotipo de los TILs en pacientes con CCRm, demostrando que el microambiente tumoral es tipo Th1.
5. El uso clínico de la inmunoterapia combinada con ADCV y avelumab (primer ensayo clínico que usa estas dos terapias conjuntamente en este tipo de pacientes) para el tratamiento del CCRm ha podido demostrar:
 - a. Es un tratamiento seguro, que no genera toxicidades relevantes.
 - b. La consecución de la estabilización de la enfermedad en 1 paciente.
 - c. Un ligero aumento de la supervivencia global, en comparación con los tratamientos estándares para este tipo de tumores.
 - d. El tratamiento es capaz de estimular al sistema inmune, pero no lo suficiente como para lograr un aumento de la supervivencia libre de progresión significativo.
 - e. No se han encontrado correlaciones entre el fenotipo de tumor (microambiente inmuno-metabólico) y la eficacia (o ausencia de la eficacia) clínica del tratamiento.
 - f. No se ha encontrado una correlación entre la frecuencia de las distintas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica que se puedan asociar a una respuesta clínica del tratamiento o el fenotipo del tumor.
 - g. Se han identificado potenciales biomarcadores de respuesta clínica a este tratamiento combinado: SDF1a y MMP-9 en suero como marcadores asociados a larga supervivencia.

- h. La determinación del HLA de los pacientes indica una asociación de los alelos B*44:02 y C*05:01 con el desarrollo de hiperprogresión de la enfermedad en respuesta a esta inmunoterapia.

VII. Bibliografía

1. Busch W. Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867. *Berl Klin Wochenschr.* 1868;5:137.
2. Fehleisen F. Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch Med Wochenschr.* 1882;8(31):553–4.
3. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg.* 1891 Sep;14(3):199–220.
4. COLEY WB. The treatment of sarcoma with the mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus. *Bost Med Surg J.* 1908;158(6):175–82.
5. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus) [Internet]. Mr. J. WARRINGTON HAWARD. 1909 [cited 2018 Nov 5]. Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.sire.ub.edu/pmc/articles/PMC1961042/pdf/procrsmed00487-0005.pdf>
6. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Jan;(262):3–11.
7. Morales A, Eidinger D. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol.* 1976;115(4):377–80.
8. Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, Angelo LS, Guimarães F, Burt BM, et al. Cancer immunotherapy: Historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. *Front Immunol.* 2017;8(AUG).
9. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Immunol Asp Neoplasia.* 1970;13:1–27.
10. Miller J, Mitchell GF, Weiss NS. Cellular basis of the immunological defects in thymectomized mice. *Nature.* 1967;214(5092):992–7.
11. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142–62.
12. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974;248(5450):701–2.
13. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* [Internet]. 1975 Feb [cited 2018 Jun 14];5(2):112–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830050208>
14. Whitney RB, Levy JG, Smith AG. Studies on the effector cell of anti-tumour immunity in a chemically induced mouse tumour system. *Br J Cancer.* 1975 Feb;31(2):157–63.
15. Smith JL, Stehlin JS. Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases. *Cancer.* 1965 Nov;18(11):1399–415.
16. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-).* 1996;271(5256):1734–6.
17. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N*

- Engl J Med. 2010;363(8):711–23.
18. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411–22.
 19. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N engl j Med.* 2011;365:725–33.
 20. Terbuch A, Lopez J. Next Generation Cancer Vaccines-Make It Personal! *Vaccines.* 2018 Aug;6(3).
 21. Buckner TW, Dunphy C, Fedoriw YD, van Deventer HW, Foster MC, Richards KL, et al. Complete spontaneous remission of diffuse large B-cell lymphoma of the maxillary sinus after concurrent infections. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Dec;12(6):455–8.
 22. Challenor S, Tucker D. SARS-CoV-2-induced remission of Hodgkin lymphoma. Vol. 192, *British journal of haematology.* England; 2021. p. 415.
 23. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol.* 2014;5:197.
 24. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35 Suppl:S185–98.
 25. Engels EA. Epidemiologic perspectives on immunosuppressed populations and the immunosurveillance and immunocontainment of cancer. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2019 Dec;19(12):3223–32.
 26. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar;331(6024):1565–70.
 27. Li B, Severson E, Pignon J-C, Zhao H, Li T, Novak J, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol.* 2016 Aug;17(1):174.
 28. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene [Internet].* 2010 Feb [cited 2018 Jun 15];29(8):1093–102. Available from: <http://www.nature.com/articles/onc2009416>
 29. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2012 Apr 15 [cited 2018 Jun 16];12(4):298–306. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3245>
 30. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991–8.
 31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences; 2014.
 32. Lurquin C, Van Pel A, Mariamé B, De Plaen E, Szikora JP, Janssens C, et al. Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell.* 1989 Jul;58(2):293–303.
 33. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer.* 2011 Mar;2(3):344–58.
 34. Leeksma OC, Kessler JH, Huijbers IJ, Ten Bosch GJ, Melief CJ. BCR-ABL directed

- immunotherapy: a virtual reality? *Leuk Lymphoma*. 2000 Jun;38(1–2):175–81.
35. DeLeo AB, Appella E. The p53 Saga: Early Steps in the Development of Tumor Immunotherapy. *J Immunol*. 2020 May;204(9):2321–8.
 36. Fournier P, Schirmacher V. Randomized clinical studies of anti-tumor vaccination: state of the art in 2008. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Jan;8(1):51–66.
 37. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:337–65.
 38. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec;254(5038):1643–7.
 39. Francoual M, Etienne-Grimaldi M-C, Formento J-L, Benchimol D, Bourgeon A, Chazal M, et al. EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006 Jun;17(6):962–7.
 40. Spano J-P, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2005 Jan;16(1):102–8.
 41. Akram N, Imran M, Noreen M, Ahmed F, Atif M, Fatima Z, et al. Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunol*. 2017;30(1):20–7.
 42. Mohammed S, Bakshi N, Chaudri N, Akhter J, Akhtar M. Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. *Adv Anat Pathol*. 2016 May;23(3):180–91.
 43. Elgui de Oliveira D, Müller-Coan BG, Pagano JS. Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. *Trends Microbiol*. 2016 Aug;24(8):649–64.
 44. Battle-Lopez A, Gonzalez de Villambrosia S, Nuñez J, Cagigal M-L, Montes-Moreno S, Conde E, et al. Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: diagnosis, difficulties and therapeutic options. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016;16(4):411–21.
 45. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Human papilloma virus (HPV) infections related to cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Ann Clin Res*. 1985;17(2):45–56.
 46. Castro Marqueta P. [Papillomavirus infection and cancer of the cervix]. *Med Clin (Barc)*. 1991 Apr;96(16):631–4.
 47. Bologna-Molina RE, Castañeda-Castaneira RE, Molina-Frechero N, Pérez-Rodríguez E. [Human papilloma virus and its association with oral cancer]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2006;44(2):147–53.
 48. Sullivan R, Dezube BJ, Koon HB. Signal transduction targets in Kaposi's sarcoma. *Curr Opin Oncol*. 2006 Sep;18(5):456–62.
 49. Mahieux R, Gessain A. Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1. *Curr Hematol Malig Rep*. 2007 Oct;2(4):257–64.
 50. Mahieux R, Gessain A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003 Dec;7(4):336–61.
 51. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999 Apr;9(2):67–81.
 52. Song P-P, Xia J-F, Inagaki Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N, et al. Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan;22(1):262–74.

53. GOLD P, FREEDMAN SO. DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES. *J Exp Med.* 1965 Mar;121(3):439–62.
54. Tessera G, Dall'Acqua S, De Bernardi A, Crivelli F, Gallioli G. [Tumor markers in colorectal neoplasm pathology: our experience of the diagnostic and prognostic importance of CEA antigen]. *Chir Ital.* 1988 Dec;40(6):377–87.
55. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell.* 1989 Apr;57(2):327–34.
56. Webb A, Scott-Mackie P, Cunningham D, Norman A, Andreyev J, O'Brien M, et al. The prognostic value of CEA, beta HCG, AFP, CA125, CA19-9 and C-erb B-2, beta HCG immunohistochemistry in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1995 Jul;6(6):581–7.
57. Kawamata F, Nishihara H, Homma S, Kato Y, Tsuda M, Konishi Y, et al. Chorionic Gonadotropin- β Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma Metastasis. *Am J Pathol.* 2018 Jan;188(1):204–15.
58. Birgisson H, Jirström K, Stenman U-H. Serum concentrations of human chorionic gonadotropin beta and its association with survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2012;11(4):173–81.
59. Kannagi R, Cai B-H, Huang H-C, Chao C-C, Sakuma K. Gangliosides and Tumors. *Methods Mol Biol.* 2018;1804:143–71.
60. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2004 Jul;122(1):61–9.
61. Lertkachonsuk A-A, Buranawongtrakoon S, Lekskul N, Rermluk N, Wee-Stekly W-W, Charakorn C. Serum CA19-9, CA-125 and CEA as tumor markers for mucinous ovarian tumors. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020 Nov;46(11):2287–91.
62. Zelenetz AD, Gordon LI, Abramson JS, Advani RH, Bartlett NL, Caimi PF, et al. NCCN Guidelines Insights: B-Cell Lymphomas, Version 3.2019. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019 Jun;17(6):650–61.
63. Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, et al. Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol.* 1995 Mar;154(5):2257–65.
64. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013 Jul;39(1):1–10.
65. Lee W, Suresh M. Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway. *Front Immunol.* 2022;13:940047.
66. Poorebrahim M, Abazari MF, Sadeghi S, Mahmoudi R, Kheirollahi A, Askari H, et al. Genetically modified immune cells targeting tumor antigens. *Pharmacol Ther.* 2020 Oct;214:107603.
67. Lei MML, Lee TKW. Cancer Stem Cells: Emerging Key Players in Immune Evasion of Cancers. *Front cell Dev Biol.* 2021;9:692940.
68. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: Molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 1999;74:181–273.

69. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*. 1993;14(10):491–9.
70. Hazini A, Fisher K, Seymour L. Deregulation of HLA-I in cancer and its central importance for immunotherapy. *J Immunother cancer*. 2021 Aug;9(8).
71. Mumm JB, Oft M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene*. 2008;27(45):5913–9.
72. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1582–92.
73. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. *Cell Metab*. 2019;30(1):36–50.
74. Stewart TJ, Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene*. 2008;27(45):5894–903.
75. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev cancer*. 2005;5(4):263–74.
76. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13(1):453–61.
77. Cui C, Lan P, Fu L. The role of myeloid-derived suppressor cells in gastrointestinal cancer. *Cancer Commun (London, England)*. 2021 Jun;41(6):442–71.
78. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Immune-Mediated Dis*. 2007;213–23.
79. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72(13):3125–30.
80. Stewart TJ, Greenelch KM, Lutsiak MEC, Abrams SI. Immunological responses can have both pro-and antitumour effects: implications for immunotherapy. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(4):1.
81. Koneru M, Schaer D, Monu N, Ayala A, Frey AB. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol*. 2005;174(4):1830–40.
82. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*. 2014;122:91–128.
83. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jovic V, Cohain A, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012;13(9):888.
84. Askenase MH, Han S-J, Byrd AL, da Fonseca DM, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-marrow-resident NK cells prime monocytes for regulatory function during infection. *Immunity*. 2015;42(6):1130–42.
85. Anderson DA, Dutertre C-A, Ginhoux F, Murphy KM. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(2):101–15.
86. Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, et al. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. 2003;424(6946):324–8.
87. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Näslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, et al. Toll-

- like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005;433(7028):887–92.
88. Bennett SRM, Carbone FR, Karamalis F, Miller JFAP, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*. 1997;186(1):65–70.
 89. Kumamoto Y, Linehan M, Weinstein JS, Laidlaw BJ, Craft JE, Iwasaki A. CD301b+ dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity*. 2013;39(4):733–43.
 90. Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and monocyte-derived CD11b+ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*. 2013;38(2):322–35.
 91. Persson EK, Uronen-Hansson H, Semmrich M, Rivollier A, Hägerbrand K, Marsal J, et al. IRF4 transcription-factor-dependent CD103+ CD11b+ dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity*. 2013;38(5):958–69.
 92. Calabro S, Gallman A, Gowthaman U, Liu D, Chen P, Liu J, et al. Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J Exp Med*. 2016;213(6):887–96.
 93. Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer’s patches. *Science* (80-). 2016;352(6287).
 94. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* (80-). 2017;356(6335).
 95. Durand M, Walter T, Pirnay T, Naessens T, Gueguen P, Goudot C, et al. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J Exp Med*. 2019;216(7):1561–81.
 96. Villar J, Segura E. The More, the Merrier: DC3s Join the Human Dendritic Cell Family. *Immunity*. 2020;53(2):233–5.
 97. Cytlak U, Resteu A, Pagan S, Green K, Milne P, Maisuria S, et al. Differential IRF8 transcription factor requirement defines two pathways of dendritic cell development in humans. *Immunity*. 2020;53(2):353–70.
 98. Bourdely P, Anselmi G, Vaivode K, Ramos RN, Missolo-Koussou Y, Hidalgo S, et al. Transcriptional and functional analysis of CD1c+ human dendritic cells identifies a CD163+ subset priming CD8+ CD103+ T cells. *Immunity*. 2020;53(2):335–52.
 99. Dutertre C-A, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, et al. Single-cell analysis of human mononuclear phagocytes reveals subset-defining markers and identifies circulating inflammatory dendritic cells. *Immunity*. 2019;51(3):573–89.
 100. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002 Dec;100(13):4512–20.
 101. Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, Thiel V, Hugues S, Reith W, et al. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(8):3012–7.
 102. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, et

- al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004 Oct;173(7):4433–42.
103. Ito T, Yang M, Wang Y-H, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007 Jan;204(1):105–15.
104. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, e Sousa CR. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (80-).* 2004;303(5663):1529–31.
105. Hayashi K, Sasai M, Iwasaki A. Toll-like receptor 9 trafficking and signaling for type I interferons requires PIKfyve activity. *Int Immunol.* 2015;27(9):435–45.
106. Brewitz A, Eickhoff S, Dähling S, Quast T, Bedoui S, Kroczeck RA, et al. CD8⁺ T cells orchestrate pDC-XCR1⁺ dendritic cell spatial and functional cooperativity to optimize priming. *Immunity.* 2017;46(2):205–19.
107. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8⁺ T cell accrual. *Immunity.* 2010;33(6):955–66.
108. Swiecki M, Wang Y, Gilfillan S, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003728.
109. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557–69.
110. Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺ CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 2010;207(6):1273–81.
111. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3–20.
112. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. In: *Seminars in cell & developmental biology.* Elsevier; 2015. p. 9–22.
113. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2013;38(2):336–48.
114. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996 Sep;196(2):137–51.
115. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul;180(1):83–93.
116. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 Apr;179(4):1109–18.
117. Dhodapkar M V, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest.* 1999 Jul;104(2):173–80.

118. Velazquez Soto H, Real F, Jiménez-Martínez MC. Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of co-stimulatory molecules. *World J Immunol.* 2022 Jan 24;12:1–8.
119. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(1):7–24.
120. Otero MJ, Pérez RS. *Inmunoterapia del cáncer. Realidades y perspectivas:* Sociedad Española de Inmunología. Elsevier España; 2015.
121. Lee K. Mechanisms and clinical applications of immunosuppressive medications. *J Korean Med Assoc.* 2020 May 10;63:251–8.
122. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, et al. Unleashing type-2 dendritic cells to drive protective antitumor CD4+ T cell immunity. *Cell.* 2019;177(3):556–71.
123. Roberts EW, Broz ML, Binnewies M, Headley MB, Nelson AE, Wolf DM, et al. Critical role for CD103+/CD141+ dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma. *Cancer Cell.* 2016;30(2):324–36.
124. Novak L, Igoucheva O, Cho S, Alexeev V. Characterization of the CCL21-mediated melanoma-specific immune responses and in situ melanoma eradication. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(6):1755–64.
125. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2018;131(1):58–67.
126. Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, et al. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med.* 1998;187(11):1849–62.
127. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang B, et al. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood.* 2005;105(8):3206–13.
128. Cohen AD, Schaer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One.* 2010;5(5):e10436.
129. Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, Taraban VY, Rogel A, Thomas LJ, et al. PD-1 blockade and CD27 stimulation activate distinct transcriptional programs that synergize for CD8+ T-cell-driven antitumor immunity. *Clin Cancer Res.* 2018;24(10):2383–94.
130. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell.* 2014;26(5):623–37.
131. Martínez-López M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Sancho D. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):119–29.
132. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfeld S, Facciotti F, Gruarin P, et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2013;122(6):932–42.
133. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-residing Batf3 dendritic cells

- are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy. *Cancer Cell*. 2017;31(5):711–23.
134. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1–22.
 135. Flies DB, Han X, Higuchi T, Zheng L, Sun J, Ye JJ, et al. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell-mediated immunity. *J Clin Invest*. 2014;124(5):1966–75.
 136. Clement M, Fornasa G, Guedj K, Mkaddem S Ben, Gaston A-T, Khallou-Laschet J, et al. CD31 is a key coinhibitory receptor in the development of immunogenic dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(12):E1101–10.
 137. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1206–12.
 138. Munn DH, Mellor AL. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol*. 2016;37(3):193–207.
 139. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 2015 Jul;523(7559):231–5.
 140. Zong J, Keskinov AA, Shurin G V, Shurin MR. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Jul;65(7):821–33.
 141. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*. 2018 Feb;172(5):1022-1037.e14.
 142. Barry KC, Hsu J, Broz ML, Cueto FJ, Binnewies M, Combes AJ, et al. A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med*. 2018 Aug;24(8):1178–91.
 143. Zelenay S, Reis e Sousa C. Reducing prostaglandin E2 production to raise cancer immunogenicity. *Oncoimmunology*. 2016 May;5(5):e1123370.
 144. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, et al. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. 2015 Sep;162(6):1257–70.
 145. Ohm JE, Shurin MR, Esche C, Lotze MT, Carbone DP, Gabrilovich DI. Effect of vascular endothelial growth factor and FLT3 ligand on dendritic cell generation in vivo. *J Immunol*. 1999 Sep;163(6):3260–8.
 146. Tang M, Diao J, Gu H, Khatri I, Zhao J, Cattral MS. Toll-like Receptor 2 Activation Promotes Tumor Dendritic Cell Dysfunction by Regulating IL-6 and IL-10 Receptor Signaling. *Cell Rep*. 2015 Dec;13(12):2851–64.
 147. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007 Sep;13(9):1050–9.
 148. Xu MM, Pu Y, Han D, Shi Y, Cao X, Liang H, et al. Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein α Signaling. *Immunity*. 2017 Aug;47(2):363-373.e5.
 149. Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol*. 2012 Sep;13(9):832–42.

150. Pan C, Liu H, Robins E, Song W, Liu D, Li Z, et al. Next-generation immunoncology agents: Current momentum shifts in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2020 Apr 3;13.
151. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017 Feb;17(2):97–111.
152. Zhang J, Pan S, Jian C, Hao L, Dong J, Sun Q, et al. Immunostimulatory Properties of Chemotherapy in Breast Cancer: From Immunogenic Modulation Mechanisms to Clinical Practice [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. 2022. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.819405>
153. Chaput N, De Botton S, Obeid M, Apetoh L, Ghiringhelli F, Panaretakis T, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Oct;85(10):1069–76.
154. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. 2009 Oct;15(10):1170–8.
155. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Aug;19(15):4046–57.
156. Proia DA, Kaufmann GF. Targeting Heat-Shock Protein 90 (HSP90) as a Complementary Strategy to Immune Checkpoint Blockade for Cancer Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2015 Jun;3(6):583–9.
157. Hato S V, Khong A, de Vries IJM, Lesterhuis WJ. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Jun;20(11):2831–7.
158. Gough MJ, Crittenden MR. Combination approaches to immunotherapy: the radiotherapy example. *Immunotherapy*. 2009 Nov;1(6):1025–37.
159. Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*. 2005 Jun;174(12):7516–23.
160. Brix N, Tiefenthaler A, Anders H, Belka C, Lauber K. Abscopal, immunological effects of radiotherapy: Narrowing the gap between clinical and preclinical experiences. *Immunol Rev*. 2017 Nov;280(1):249–79.
161. Bhattacharyya T, Purushothaman K, Puthiyottil SSV, Bhattacharjee A, Muttah G. Immunological interactions in radiotherapy-opening a new window of opportunity. *Ann Transl Med*. 2016 Feb;4(3):51.
162. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*. 2006 May;203(5):1259–71.
163. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res*. 2000 Jul;60(13):3542–9.
164. Nava S, Lisini D, Frigerio S, Bersano A. Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy: The Adjuvant Effect. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov;22(22).
165. Whiteside TL, Demaria S, Rodriguez-Ruiz ME, Zarour HM, Melero I. Emerging Opportunities and Challenges in Cancer Immunotherapy. *Clin cancer Res an Off*

- J Am Assoc Cancer Res. 2016 Apr;22(8):1845–55.
166. Han X-J, Ma X-L, Yang L, Wei Y-Q, Peng Y, Wei X-W. Progress in Neoantigen Targeted Cancer Immunotherapies. *Front cell Dev Biol.* 2020;8:728.
 167. Bindon C, Czerniecki M, Ruell P, Edwards A, McCarthy WH, Harris R, et al. Clearance rates and systemic effects of intravenously administered interleukin 2 (IL-2) containing preparations in human subjects. *Br J Cancer.* 1983 Jan;47(1):123–33.
 168. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985 Dec;313(23):1485–92.
 169. Safadi MG, Hassan S, Patel V, Viglione M, Zahner SL. Imiquimod-induced hypertrophic lupus erythematosus-like reaction. *Dermatol Online J.* 2022 Aug;28(4).
 170. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 2018;9:847.
 171. Humphries C. Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature.* 2013 Dec;504(7480):S13-5.
 172. Southam CM, Brunschwig A, Levin AG, Dizon QS. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer.* 1966 Nov;19(11):1743–53.
 173. Spiess PJ, Yang JC, Rosenberg SA. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1987 Nov [cited 2018 Jun 15];79(5):1067–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3500355>
 174. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1994 Aug 3 [cited 2018 Jun 15];86(15):1159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8028037>
 175. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2018 Jun 15];17(13):4550–7. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>
 176. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003 Sep [cited 2018 Jun 17];3(9):666–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951585>
 177. Dudley ME, Gross CA, Langan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, et al. CD8+ Enriched “Young” Tumor Infiltrating Lymphocytes Can Mediate Regression of Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2018 Jun 15];16(24):6122–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668005>
 178. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2001;24(4):363–73.

179. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother*. 2002;25(3):243–51.
180. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch*. 2019 Apr;474(4):449–61.
181. Walia V, Mu EW, Lin JC, Samuels Y. Delving into somatic variation in sporadic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 Mar;25(2):155–70.
182. Qin SS, Melucci AD, Chacon AC, Prieto PA. Adoptive T Cell Therapy for Solid Tumors: Pathway to Personalized Standard of Care. *Cells*. 2021 Apr;10(4).
183. Kirtane K, Elmariah H, Chung CH, Abate-Daga D. Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead. *J Immunother cancer*. 2021 Jul;9(7).
184. Andersen R, Donia M, Ellebaek E, Borch TH, Kongsted P, Iversen TZ, et al. Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Aug;22(15):3734–45.
185. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu Y-C, Zheng Z, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med [Internet]*. 2018;24(6):724–30. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-018-0040-8>
186. Titov A, Zmievskaya E, Ganeeva I, Valiullina A, Petukhov A, Rakhmatullina A, et al. Adoptive Immunotherapy beyond CAR T-Cells. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb;13(4).
187. Kalbasi A, Ribas A. Antigen Presentation Keeps Trending in Immunotherapy Resistance. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Jul;24(14):3239–41.
188. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med*. 2018 Jul;379(1):64–73.
189. Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res*. 2020 Jun;30(6):507–19.
190. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009 Jul;114(3):535–46.
191. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013 Feb;36(2):133–51.
192. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):914–21.
193. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan D-AN, Feldman SA, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*. 2011 Mar;19(3):620–6.

194. T Cell Receptor Based Therapy of Metastatic Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Oct 8]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03431311?cond=Colorectal+Cancer&intr=TGFβII&draw=2&rank=1>
195. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev.* 2019 Jul;290(1):127–47.
196. Tariq SM, Haider SA, Hasan M, Tahir A, Khan M, Rehan A, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Beacon of Hope in the Fight Against Cancer. *Cureus.* 2018 Oct;10(10):e3486.
197. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011 Aug;3(95):95ra73.
198. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):215–23.
199. Davila ML, Bouhassira DCG, Park JH, Curran KJ, Smith EL, Pegram HJ, et al. Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol.* 2014 Apr;99(4):361–71.
200. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013 Mar;5(177):177ra38.
201. Brudno JN, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Jan;15(1):31–46.
202. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018 Feb;378(5):449–59.
203. Cappell KM, Sherry RM, Yang JC, Goff SL, Vanasse DA, McIntyre L, et al. Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2020 Nov;38(32):3805–15.
204. First-Ever CAR T-cell Therapy Approved in U.S. *Cancer Discov.* 2017 Oct;7(10):OF1.
205. FDA Approves Second CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* 2018 Jan;8(1):5–6.
206. Brown CE, Mackall CL. CAR T cell therapy: inroads to response and resistance. *Nat Rev Immunol.* 2019 Feb;19(2):73–4.
207. Beatty GL, Haas AR, Maus M V, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res.* 2014 Feb;2(2):112–20.
208. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006 Oct;12(20 Pt 1):6106–15.
209. Majzner RG, Theruvath JL, Nellan A, Heitzeneder S, Cui Y, Mount CW, et al. CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors. *Clin cancer Res an Off*

- J Am Assoc Cancer Res. 2019 Apr;25(8):2560–74.
210. Pituch KC, Miska J, Krenciute G, Panek WK, Li G, Rodriguez-Cruz T, et al. Adoptive Transfer of IL13R α 2-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Creates a Pro-inflammatory Environment in Glioblastoma. *Mol Ther*. 2018 Apr;26(4):986–95.
 211. Miao H, Choi BD, Suryadevara CM, Sanchez-Perez L, Yang S, De Leon G, et al. EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an invasive xenograft model of glioblastoma. *PLoS One*. 2014;9(4):e94281.
 212. Lázaro-Gorines R, Ruiz-de-la-Herrán J, Navarro R, Sanz L, Álvarez-Vallina L, Martínez-Del-Pozo A, et al. A novel Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Targeted Trimeric Immunotoxin shows significantly enhanced Antitumor Activity in Human Colorectal Cancer Xenografts. *Sci Rep*. 2019 Aug;9(1):11680.
 213. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018 Mar;359(6382):1361–5.
 214. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 2016 Jun;127(26):3321–30.
 215. Grigor EJM, Fergusson D, Kekre N, Montroy J, Atkins H, Seftel MD, et al. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfus Med Rev*. 2019 Apr;33(2):98–110.
 216. Anand K, Burns E, Sano D, Pingali SR, Westin J, Nastoupil LJ, et al. Comprehensive report of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) associated non-relapse mortality (CART-NRM) from FAERS. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019 May 20;37(15_suppl):2540. Available from: https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2540
 217. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):843–51.
 218. Sur D, Havasi A, Cainap C, Samasca G, Burz C, Balacescu O, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Colorectal Cancer. *J Clin Med*. 2020 Jan;9(1).
 219. Hege KM, Bergsland EK, Fisher GA, Nemunaitis JJ, Warren RS, McArthur JG, et al. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer. *J Immunother cancer*. 2017;5:22.
 220. Magee MS, Abraham TS, Baybutt TR, Flickinger JCJ, Ridge NA, Marszalowicz GP, et al. Human GUCY2C-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Expressing T Cells Eliminate Colorectal Cancer Metastases. *Cancer Immunol Res*. 2018 May;6(5):509–16.
 221. EGFR CART Cells for Patients With Metastatic Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Oct 8]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03152435?cond=EGFR+CART&draw=2&rank=1>
 222. EGFR-IL12-CART Cells for Patients With Metastatic Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Oct 8]. Available from:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03542799?cond=EGFR-IL12-CART&draw=2&rank=1>
223. Zhang B-L, Li D, Gong Y-L, Huang Y, Qin D-Y, Jiang L, et al. Preclinical Evaluation of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Specific to Epithelial Cell Adhesion Molecule for Treating Colorectal Cancer. *Hum Gene Ther.* 2019 Apr;30(4):402–12.
 224. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975 Aug;256(5517):495–7.
 225. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Oct;12(5):615–22.
 226. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug;58(5–6):640–56.
 227. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs.* 2010;2(3):256–65.
 228. Mallbris L, Davies J, Glasebrook A, Tang Y, Glaesner W, Nickoloff BJ. Molecular Insights into Fully Human and Humanized Monoclonal Antibodies: What are the Differences and Should Dermatologists Care? *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016 Jul;9(7):13–5.
 229. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7(1):9–14.
 230. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020 Jan;27(1):1.
 231. Thomas A, Liu S V, Subramaniam DS, Giaccone G. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Sep;12(9):511–26.
 232. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jan;9(1):28–39.
 233. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol.* 2021 Jan;16:223–49.
 234. Ott PA, Bang Y-J, Piha-Paul SA, Razak ARA, Bennouna J, Soria J-C, et al. T-Cell-Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2019 Feb;37(4):318–27.
 235. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013 Apr;13(4):227–42.
 236. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. Vol. 471, *Nature.* England; 2011. p. 561.
 237. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, Yuan M, Rodriguez L, Gallagher PS, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Tumor Mutational Burden-High Solid Tumors. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2021 Sep;27(17):4685–9.
 238. Galluzzi L, Kroemer G, Eggermont A. Novel immune checkpoint blocker

- approved for the treatment of advanced melanoma. *Oncoimmunology*. 2014 Nov;3(11):e967147.
239. First Anti-PD-L1 Drug Approved for NSCLC. *Cancer Discov*. 2016 Dec;6(12):OF1.
240. Syed YY. Durvalumab: First Global Approval. *Drugs*. 2017 Aug;77(12):1369–76.
241. Kim ES. Avelumab: First Global Approval. *Drugs*. 2017 May;77(8):929–37.
242. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459–65.
243. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765–72.
244. Marin-Acevedo JA, Kimbrough EO, Lou Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J Hematol Oncol*. 2021 Mar;14(1):45.
245. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. 2012 [cited 2018 Nov 5]; Available from: www.nature.com/reviews/cancer
246. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev*. 2002 Oct;188:97–113.
247. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Mar;54(3):187–207.
248. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1975 Feb;53(1):27–42.
249. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991 Sep;174(3):561–9.
250. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):12–26.
251. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*. 1994 Aug;180(2):631–40.
252. Morad G, Helmink BA, Sharma P, Wargo JA. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell*. 2021 Oct;184(21):5309–37.
253. Kelderman S, Schumacher TNM, Haanen JBAG. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Mol Oncol*. 2014 Sep;8(6):1132–9.
254. Restifo NP, Smyth MJ, Snyder A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat Rev Cancer*. 2016 Feb;16(2):121–6.
255. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015 Oct;350(6257):207–11.
256. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun;372(26):2509–20.
257. Gao J, Shi LZ, Zhao H, Chen J, Xiong L, He Q, et al. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*. 2016 Oct;167(2):397–404.e9.
258. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five

- patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Jan;88(2):100–8.
259. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu W-J, Weber JS, Ribas A, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016 Dec;34(34):4102–9.
260. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015 Nov;350(6264):1079–84.
261. Keenan TE, Burke KP, Van Allen EM. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat Med.* 2019 Mar;25(3):389–402.
262. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother cancer.* 2018 Dec;6(1):157.
263. Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, Niknafs N, Bhattacharya R, White J, et al. Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2017 Mar;7(3):264–76.
264. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2016 Sep;375(9):819–29.
265. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019 Aug;234(10):16824–37.
266. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009 Aug;114(8):1537–44.
267. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct;192(7):1027–34.
268. Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, et al. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Jun;23(12):3158–67.
269. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007 Jul;27(1):111–22.
270. Li B, Chan HL, Chen P. Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *Curr Med Chem.* 2019;26(17):3009–25.
271. Walker LSK. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun.* 2013 Sep;45(100):49–57.
272. McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol.* 1999 Feb;77(1):1–10.
273. Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JMA, Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity.* 2004 Mar;20(3):327–36.
274. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol.* 1998 Oct;10(10):1563–72.

275. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* (London, England). 2014 Sep;384(9948):1109–17.
276. Robert C, Schachter J, Long G V, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jun;372(26):2521–32.
277. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov;375(19):1823–33.
278. Patnaik A, Kang SP, Rasco D, Papadopoulos KP, Elassaiss-Schaap J, Beeram M, et al. Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Oct;21(19):4286–93.
279. Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications FDA Web site, 2015. [Internet]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-informationapproved-drugs/hematologyoncology-cancer-approvalssafety-notifications>
280. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, Mushti S, He K, Libeg M, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist*. 2016 May;21(5):634–42.
281. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Jul;25(13):3753–8.
282. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*. 2019 Sep;12(1):92.
283. Yi M, Zheng X, Niu M, Zhu S, Ge H, Wu K. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer* [Internet]. 2022;21(1):28. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01489-2>
284. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer*. 2019 Nov;18(1):155.
285. Yi M, Jiao D, Qin S, Chu Q, Wu K, Li A. Synergistic effect of immune checkpoint blockade and anti-angiogenesis in cancer treatment. *Mol Cancer*. 2019 Mar;18(1):60.
286. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2019 Aug;12(1):86.
287. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Jan;29(1):84–91.
288. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014 Nov;515(7528):563–7.
289. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*.

- 2014 Apr;32(10):1020–30.
290. Timmermann B, Kerick M, Roehr C, Fischer A, Isau M, Boerno ST, et al. Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PLoS One*. 2010 Dec;5(12):e15661.
291. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001 Jun;91(12):2417–22.
292. Lin EI, Tseng L-H, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS, et al. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget*. 2015 Dec;6(39):42334–44.
293. Gong J, Wang C, Lee PP, Chu P, Fakhri M. Response to PD-1 Blockade in Microsatellite Stable Metastatic Colorectal Cancer Harboring a POLE Mutation. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Feb;15(2):142–7.
294. Cohen R, Rousseau B, Vidal J, Colle R, Diaz LAJ, André T. Immune Checkpoint Inhibition in Colorectal Cancer: Microsatellite Instability and Beyond. *Target Oncol*. 2020 Feb;15(1):11–24.
295. Ros J, Balconi F, Baraibar I, Saoudi Gonzalez N, Salva F, Tabernero J, et al. Advances in immune checkpoint inhibitor combination strategies for microsatellite stable colorectal cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1112276.
296. Shang N, Figini M, Shangguan J, Wang B, Sun C, Pan L, et al. Dendritic cells based immunotherapy. *Am J Cancer Res*. 2017;7(10):2091–102.
297. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):e257-67.
298. Kumar C, Kohli S, Bapsy PP, Vaid AK, Jain M, Attili VSS, et al. Immune modulation by dendritic-cell-based cancer vaccines. *J Biosci*. 2017 Mar;42(1):161–73.
299. Melief CJM, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3401–12.
300. Kenter GG, Welters MJM, Valentijn ARPM, Lowik MJG, Berends-van der Meer DMA, Vloon APG, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*. 2009 Nov;361(19):1838–47.
301. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, Lupardus P, Tanguay J, Bumbaca S, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 2014 Nov;515(7528):572–6.
302. Stern PL, Harrop R. 5T4 oncofoetal antigen: an attractive target for immune intervention in cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 Apr;66(4):415–26.
303. Schietinger A, Philip M, Schreiber H. Specificity in cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2008 Oct;20(5):276–85.
304. Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018 Mar;18(3):168–82.
305. Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res*. 2017 Aug;65(4):798–810.
306. Sadeghzadeh M, Bornehdeli S, Mohammadrezakhani H, Abolghasemi M, Poursaei E, Asadi M, et al. Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. *Life Sci*. 2020 Aug;254:117580.
307. Zhao L, Zhang M, Cong H. Advances in the study of HLA-restricted epitope

- vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Dec;9(12):2566–77.
308. Bezu L, Kepp O, Cerrato G, Pol J, Fucikova J, Spisek R, et al. Trial watch: Peptide-based vaccines in anticancer therapy. *Oncoimmunology.* 2018;7(12):e1511506.
309. Harari A, Graciotti M, Bassani-Sternberg M, Kandalaft LE. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 Sep;19(9):635–52.
310. Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev.* 2004;199(1):251–63.
311. Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, et al. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg.* 2002;235(4):540.
312. Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Agostinis P. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol.* 2017 Aug;38(8):577–93.
313. Seyfizadeh N, Muthuswamy R, Mitchell DA, Nierkens S, Seyfizadeh N. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Nov;107:100–10.
314. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. Migration of cultured chimpanzee dendritic cells following intravenous and subcutaneous injection. *Adv Exp Med Biol.* 1997;417:71–5.
315. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, et al. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999 Jun;5(6):1331–8.
316. Aarntzen EH, Srinivas M, Schreiber G, Heerschap A, Punt CJ, Figdor CG, et al. Reducing cell number improves the homing of dendritic cells to lymph nodes upon intradermal vaccination. *Oncoimmunology.* 2013 Jul;2(7):e24661.
317. Figdor CG, de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004 May;10(5):475–80.
318. Butterfield LH. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Front Immunol.* 2013 Dec;4:454.
319. Hori Y, Winans AM, Huang CC, Horrigan EM, Irvine DJ. Injectable dendritic cell-carrying alginate gels for immunization and immunotherapy. *Biomaterials.* 2008 Sep;29(27):3671–82.
320. Verma V, Kim Y, Lee M-C, Lee J-T, Cho S, Park I-K, et al. Activated dendritic cells delivered in tissue compatible biomatrices induce in-situ anti-tumor CTL responses leading to tumor regression. *Oncotarget.* 2016 Jun;7(26):39894–906.
321. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Apr;104(8):599–613.
322. Wheeler CJ, Das A, Liu G, Yu JS, Black KL. Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2004 Aug;10(16):5316–26.
323. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):1991–2001.
324. Garnett-Benson C, Hodge JW, Gameiro SR. Combination regimens of radiation

- therapy and therapeutic cancer vaccines: mechanisms and opportunities. *Semin Radiat Oncol*. 2015 Jan;25(1):46–53.
325. Akutsu Y, Matsubara H, Urashima T, Komatsu A, Sakata H, Nishimori T, et al. Combination of direct intratumoral administration of dendritic cells and irradiation induces strong systemic antitumor effect mediated by GRP94/gp96 against squamous cell carcinoma in mice. *Int J Oncol*. 2007 Sep;31(3):509–15.
326. Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, Shibata S, Komaru A, Ueda Y, et al. Complete elimination of established neuroblastoma by synergistic action of gamma-irradiation and DCs treated with rSeV expressing interferon-beta gene. *Gene Ther*. 2009 Feb;16(2):240–51.
327. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother cancer*. 2015;3:51.
328. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*. 2005 Oct;106(7):2375–81.
329. Rossowska J, Anger N, Kicielińska J, Pajtasz-Piasecka E, Bielawska-Pohl A, Wojas-Turek J, et al. Temporary elimination of IL-10 enhanced the effectiveness of cyclophosphamide and BMDC-based therapy by decrease of the suppressor activity of MDSCs and activation of antitumour immune response. *Immunobiology*. 2015 Mar;220(3):389–98.
330. Lowe DB, Bose A, Taylor JL, Tawbi H, Lin Y, Kirkwood JM, et al. Dasatinib promotes the expansion of a therapeutically superior T-cell repertoire in response to dendritic cell vaccination against melanoma. *Oncoimmunology*. 2014 Jan;3(1):e27589.
331. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, Vasir B, Tzachanis D, Levine JD, et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J Immunother*. 2011 Jun;34(5):409–18.
332. Nagaoka K, Hosoi A, Iino T, Morishita Y, Matsushita H, Kakimi K. Dendritic cell vaccine induces antigen-specific CD8(+) T cells that are metabolically distinct from those of peptide vaccine and is well-combined with PD-1 checkpoint blockade. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1395124.
333. Boudewijns S, Koornstra RHT, Westdorp H, Schreiber G, van den Eertwegh AJM, Geukes Foppen MH, et al. Ipilimumab administered to metastatic melanoma patients who progressed after dendritic cell vaccination. *Oncoimmunology*. 2016 Aug;5(8):e1201625.
334. Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, Jalil J, de la Rocha P, McCannel TA, et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Oct;15(19):6267–76.
335. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, et al. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Apr;34(12):1330–8.
336. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:369.

337. Lesterhuis WJ, de Vries IJM, Schuurhuis DH, Boullart ACI, Jacobs JFM, de Boer AJ, et al. Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006 Jun;17(6):974–80.
338. Berry J, Vreeland T, Trappey A, Hale D, Peace K, Tyler J, et al. Cancer vaccines in colon and rectal cancer over the last decade: lessons learned and future directions. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017 Mar;13(3):235–45.
339. Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 May;12(10):3064–9.
340. Gulley JL, Madan RA, Schlom J. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Curr Oncol*. 2011 Jun;18(3):e150-7.
341. Bol KF, Aarntzen EHJG, Hout FEM In 't, Schreiber G, Creemers JHA, Lesterhuis WJ, et al. Favorable overall survival in stage III melanoma patients after adjuvant dendritic cell vaccination. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1057673.
342. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
343. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145–64.
344. Formslag CR, Zhao L, Heslin AJ, Lewis CC, Miller CW, Bai Q, et al. The past, present, and future of immunotherapy for colorectal cancer. *Med Oncol*. 2023 Feb;40(3):95.
345. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*. 2019 Oct;394(10207):1467–80.
346. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008 Dec;300(23):2765–78.
347. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ*. 2014 Nov;23(6):532–9.
348. Kyrgiou M, Kalliala I, Markozannes G, Gunter MJ, Paraskevidis E, Gabra H, et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ*. 2017 Feb;356:j477.
349. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
350. Kather JN, Halama N, Jaeger D. Genomics and emerging biomarkers for immunotherapy of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52(Pt 2):189–97.
351. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350–6.
352. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022

- Mar;14(7).
353. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021 Oct;21(10):653–67.
 354. Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar;5(1):22.
 355. Gutting T, Burgermeister E, Härtel N, Ebert MP. Checkpoints and beyond - Immunotherapy in colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*. 2019 Apr;55:78–89.
 356. Champiat S, Derclé L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Apr;23(8):1920–8.
 357. Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, Coloma VP, Servois V, Paoletti X, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Jul;28(7):1605–11.
 358. Kato S, Goodman A, Walavalkar V, Barkauskas DA, Sharabi A, Kurzrock R. Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Aug;23(15):4242–50.
 359. Lo Russo G, Moro M, Sommariva M, Cancila V, Boeri M, Centonze G, et al. Antibody-Fc/FcR Interaction on Macrophages as a Mechanism for Hyperprogressive Disease in Non-small Cell Lung Cancer Subsequent to PD-1/PD-L1 Blockade. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Feb;25(3):989–99.
 360. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):52–8.
 361. Heße C, Kollenda S, Rotan O, Pastille E, Adamczyk A, Wenzek C, et al. A Tumor-Peptide-Based Nanoparticle Vaccine Elicits Efficient Tumor Growth Control in Antitumor Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2019 Jun;18(6):1069–80.
 362. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018 Feb;554(7693):538–43.
 363. Buset M, Winawer S, Friedman E. Defining conditions to promote the attachment of adult human colonic epithelial cells. *Vitr Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc*. 1987 Jun;23(6):403–12.
 364. Deveney CW, Rand-Luby L, Rutten MJ, Luttrupp CA, Fowler WM, Land J, et al. Establishment of human colonic epithelial cells in long-term culture. *J Surg Res*. 1996 Aug;64(2):161–9.
 365. Panja A. A novel method for the establishment of a pure population of nontransformed human intestinal primary epithelial cell (HIPEC) lines in long term culture. *Lab Invest*. 2000 Sep;80(9):1473–5.
 366. Crystal AS, Shaw AT, Sequist L V, Friboulet L, Niederst MJ, Lockerman EL, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science*. 2014 Dec;346(6216):1480–6.
 367. Fujimoto H, Saito Y, Ohuchida K, Kawakami E, Fujiki S, Watanabe T, et al. Deregulated Mucosal Immune Surveillance through Gut-Associated Regulatory T

- Cells and PD-1(+) T Cells in Human Colorectal Cancer. *J Immunol.* 2018 May;200(9):3291–303.
368. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mangu S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011 Feb;71(4):1263–71.
369. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005 Dec;353(25):2654–66.
370. Wang T, Tang L, Ouyang B, Chen X, Qi J. Clinical significance and changes to the immune microenvironment of colorectal cancer patients with liver metastasis. *J Gastrointest Oncol.* 2023 Feb;14(1):206–12.
371. Fakih M, Ouyang C, Wang C, Tu TY, Gozo MC, Cho M, et al. Immune overdrive signature in colorectal tumor subset predicts poor clinical outcome. *J Clin Invest.* 2019 Oct;129(10):4464–76.
372. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science (80-) [Internet].* 2006 Sep 29 [cited 2018 Jun 16];313(5795):1960–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008531>
373. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015 Jan;5(1):43–51.
374. Csiszár A, Szentes T, Haraszi B, Zou W, Emilie D, Petrányi G, et al. Characterisation of cytokine mRNA expression in tumour-infiltrating mononuclear cells and tumour cells freshly isolated from human colorectal carcinomas. *Eur Cytokine Netw.* 2001 Mar;12(1):87–96.
375. Bai Z, Zhou Y, Ye Z, Xiong J, Lan H, Wang F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:808964.
376. Yang X, Qi Q, Pan Y, Zhou Q, Wu Y, Zhuang J, et al. Single-Cell Analysis Reveals Characterization of Infiltrating T Cells in Moderately Differentiated Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2020;11:620196.
377. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* 2016 Apr;15(4):857–65.
378. Sasidharan Nair V, Toor SM, Taha RZ, Ahmed AA, Kurer MA, Murshed K, et al. Transcriptomic Profiling of Tumor-Infiltrating CD4(+)TIM-3(+) T Cells Reveals Their Suppressive, Exhausted, and Metastatic Characteristics in Colorectal Cancer Patients. *Vaccines.* 2020 Feb;8(1).
379. Zhang Y, Zheng L, Zhang L, Hu X, Ren X, Zhang Z. Deep single-cell RNA sequencing data of individual T cells from treatment-naïve colorectal cancer patients. *Sci data.* 2019 Jul;6(1):131.
380. Yarchoan M, Huang C-Y, Zhu Q, Ferguson AK, Durham JN, Anders RA, et al. A phase 2 study of GVAX colon vaccine with cyclophosphamide and pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient advanced colorectal

- cancer. *Cancer Med.* 2020 Feb;9(4):1485–94.
381. Martinelli E, Martini G, Famiglietti V, Troiani T, Napolitano S, Pietrantonio F, et al. Cetuximab Rechallenge Plus Avelumab in Pretreated Patients With RAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer: The Phase 2 Single-Arm Clinical CAVE Trial. *JAMA Oncol.* 2021 Oct;7(10):1529–35.
382. Cousin S, Cantarel C, Guegan J-P, Gomez-Roca C, Metges J-P, Adenis A, et al. Regorafenib-Avelumab Combination in Patients with Microsatellite Stable Colorectal Cancer (REGOMUNE): A Single-arm, Open-label, Phase II Trial. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2021 Apr;27(8):2139–47.
383. Chennamadhavuni A, Abushahin L, Jin N, Presley CJ, Manne A. Risk Factors and Biomarkers for Immune-Related Adverse Events: A Practical Guide to Identifying High-Risk Patients and Rechallenging Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 2022;13:779691.
384. von Itzstein MS, Khan S, Gerber DE. Investigational Biomarkers for Checkpoint Inhibitor Immune-Related Adverse Event Prediction and Diagnosis. *Clin Chem.* 2020 Jun;66(6):779–93.
385. Burgdorf SK, Claesson MH, Nielsen HJ, Rosenberg J. Changes in cytokine and biomarker blood levels in patients with colorectal cancer during dendritic cell-based vaccination. *Acta Oncol.* 2009;48(8):1157–64.
386. Koido S, Hara E, Homma S, Torii A, Mitsunaga M, Yanagisawa S, et al. Streptococcal preparation OK-432 promotes fusion efficiency and enhances induction of antigen-specific CTL by fusions of dendritic cells and colorectal cancer cells. *J Immunol.* 2007 Jan;178(1):613–22.
387. Liu J, Zhang S, Hu Y, Yang Z, Li J, Liu X, et al. Targeting PD-1 and Tim-3 Pathways to Reverse CD8 T-Cell Exhaustion and Enhance Ex Vivo T-Cell Responses to Autologous Dendritic/Tumor Vaccines. *J Immunother.* 2016 May;39(4):171–80.
388. Babatz J, Röllig C, Oelschlägel U, Zhao S, Ehninger G, Schmitz M, et al. Large-scale immunomagnetic selection of CD14+ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study. *J Hematother Stem Cell Res.* 2003 Oct;12(5):515–23.
389. Caballero-Baños M, Benitez-Ribas D, Tabera J, Varea S, Vilana R, Bianchi L, et al. Phase II randomised trial of autologous tumour lysate dendritic cell plus best supportive care compared with best supportive care in pre-treated advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer.* 2016 Sep;64:167–74.
390. Cheng J, Song X, Ao L, Chen R, Chi M, Guo Y, et al. Shared liver-like transcriptional characteristics in liver metastases and corresponding primary colorectal tumors. *J Cancer.* 2018;9(8):1500–5.
391. Zhang T, Guo J, Gu J, Wang Z, Wang G, Li H, et al. Identifying the key genes and microRNAs in colorectal cancer liver metastasis by bioinformatics analysis and in vitro experiments. *Oncol Rep.* 2019 Jan;41(1):279–91.
392. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell.* 2011 Jan;19(1):31–44.
393. Guo G, Wang Y, Zhou Y, Quan Q, Zhang Y, Wang H, et al. Immune cell concentrations among the primary tumor microenvironment in colorectal cancer patients predicted by clinicopathologic characteristics and blood indexes.

- J Immunother cancer. 2019 Jul;7(1):179.
394. Sirniö P, Väyrynen JP, Klintrup K, Mäkelä J, Mäkinen MJ, Karttunen TJ, et al. Decreased serum apolipoprotein A1 levels are associated with poor survival and systemic inflammatory response in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2017 Jul;7(1):5374.
395. Ruscica M, Botta M, Ferri N, Giorgio E, Macchi C, Franceschini G, et al. High Density Lipoproteins Inhibit Oxidative Stress-Induced Prostate Cancer Cell Proliferation. *Sci Rep*. 2018 Feb;8(1):2236.
396. Reis LM Dos, Adamoski D, Ornitz Oliveira Souza R, Rodrigues Ascenção CF, Sousa de Oliveira KR, Corrêa-da-Silva F, et al. Dual inhibition of glutaminase and carnitine palmitoyltransferase decreases growth and migration of glutaminase inhibition-resistant triple-negative breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2019 Jun;294(24):9342–57.
397. Negrao M V, Lam VK, Reuben A, Rubin ML, Landry LL, Roarty EB, et al. PD-L1 Expression, Tumor Mutational Burden, and Cancer Gene Mutations Are Stronger Predictors of Benefit from Immune Checkpoint Blockade than HLA Class I Genotype in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2019 Jun;14(6):1021–31.
398. Abed A, Calapre L, Lo J, Correia S, Bowyer S, Chopra A, et al. Prognostic value of HLA-I homozygosity in patients with non-small cell lung cancer treated with single agent immunotherapy. *J Immunother cancer*. 2020 Nov;8(2).
399. Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane J-P, et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun*. 2017 Oct;8(1):1136.
400. Naranbhai V, Viard M, Dean M, Groha S, Braun DA, Labaki C, et al. HLA-A*03 and response to immune checkpoint blockade in cancer: an epidemiological biomarker study. *Lancet Oncol*. 2022 Jan;23(1):172–84.

VIII. Anexos

RESEARCH



A Phase I-II multicenter trial with Avelumab plus autologous dendritic cell vaccine in pre-treated mismatch repair-proficient (MSS) metastatic colorectal cancer patients; GEMCAD 1602 study

Marta Español-Rego¹ · Carlos Fernández-Martos² · Elena Elez³ · Carles Foguet⁴ · Leire Pedrosa⁵ · Nuria Rodríguez⁶ · Ana Ruiz-Casado⁷ · Estela Pineda⁵ · Joan Cid⁸ · Raquel Cabezón¹ · Helena Oliveres⁵ · Miquel Lozano⁸ · Angels Ginés^{9,14} · Angeles García-Criado¹⁰ · Juan Ramon Ayuso¹⁰ · Mario Pagés¹⁰ · Miriam Cuatrecasas^{11,14} · Ferràn Torres¹² · Timothy Thomson^{13,14,15} · Marta Cascante^{4,14} · Daniel Benítez-Ribas¹ · Joan Maurel^{5,14}

Received: 18 July 2022 / Accepted: 15 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Background Immune check-point blockade (ICB) has shown clinical benefit in mismatch repair-deficient/microsatellite instability high metastatic colorectal cancer (mCRC) but not in mismatch repair-proficient/microsatellite stable patients. Cancer vaccines with autologous dendritic cells (ADC) could be a complementary therapeutic approach to ICB as this combination has the potential to achieve synergistic effects.

Methods This was a Phase I/II multicentric study with translational sub-studies, to evaluate the safety, pharmacodynamics and anti-tumor effects of Avelumab plus ADC vaccine in heavily pre-treated MSS mCRC patients. Primary objective was to determine the maximum tolerated dose and the efficacy of the combination. The primary end-point was 40% progression-free survival at 6 months with a 2 Simon Stage.

Results A total of 28 patients were screened and 19 pts were included. Combined therapy was safe and well tolerated. An interim analysis (Simon design first-stage) recommended early termination because only 2/19 (11%) patients were disease free at 6 months. Median PFS was 3.1 months [2.1–5.3 months] and overall survival was 12.2 months [3.2–23.2 months]. Stimulation of immune system was observed in vitro but not clinically. The evaluation of basal RNA-seq noted significant changes between pre and post-therapy liver biopsies related to lipid metabolism and transport, inflammation and oxidative stress pathways.

Conclusions The combination of Avelumab plus ADC vaccine is safe and well tolerated but exhibited modest clinical activity. Our study describes, for the first-time, a de novo post-therapy metabolic rewiring, that could represent novel immunotherapy-induced tumor vulnerabilities.

Keywords Vaccines · Metabolism · Resistance

Abbreviations

ADC	Autologous dendritic cells	BCKA	Branched chain ketoacids
ADCC	Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity	CR	Complete response
ADCP	Antibody dependent cellular phagocytosis	DLT	Dose limiting toxicity
ATMLR	Tumor mixed leucocyte reaction	ECOG	Eastern cooperative oncology group
BOR	Best overall response	ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
BSC	Best supportive care	FasL	Fas ligand
		FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
		GEMCAD	Grupo español multidisciplinar en cáncer digestivo
		GEP	Gene expression profile
		HPD	Hyper-progressive disease
		ICB	Immune check-point blockade
		IEC	Independent ethics committee
		IFN γ	Interferon gamma
		IL-2	Interleukin 2

Trial registration: ClinicalTrials.gov (NCT03152565).

✉ Daniel Benítez-Ribas
DBENITEZR@clinic.cat

✉ Joan Maurel
JMAUREL@clinic.cat

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 09 September 2022

Springer

IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-17a	Interleukin 17A
IL-23	Interleukin 23
IRB	Institutional review board
LDH	Lactate dehydrogenase level
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
mCRC	Metastatic colorectal cancer
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MSS	Mismatch repair-proficient
NE	Not evaluable
OS	Overall survival
PD	Progression of disease
PD-L1	Programmed death ligand-1
PFS	Progression-free survival
PR	Partial response
PS	Performance status
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RECIST 1.1	Response evaluation criteria in solid tumors
SD	Stable disease
SCDF1	Stromal cell-derived factor 1
TGFβ1	Transforming growth factor β 1
TGFβ3	Transforming growth factor β-3
TMB	Tumor mutational burden
ULN	Upper limit normal
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VEGF-B	Vascular endothelial growth factor B
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C

Introduction

Immune checkpoint-blockade inhibitors (*ICB*) have shown high activity in MSI colorectal cancer [1–4]. However, this therapeutic approach has limited efficacy in cancers with low tumor mutational burden, such as MSS colorectal cancer, with < 5% best overall response (BOR), 2.2 months median progression-free survival (PFS), 5 months median overall survival and < 20% PFS at 6 months [5].

Immunohistochemical (IHC) analysis of programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive biomarker has been confounded by multiple unresolved issues that have cast doubt on PD-L1 as an adequate predictive biomarker for *ICB* response. More recently transcriptomic signatures suggest that capturing the complexity of the immune system might be a better strategy to evaluate anti-PD-L1 inhibitor efficacy [6–8]. Our group has recently discovered an immune-metabolic-signature (IMMETCOLS) that appears to identify, across tumor-types, three distinct Clusters with potential clinical implications [9].

Cancer vaccines could be a complementary therapeutic approach to *ICB*. These vaccines aim to stimulate tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes that recognize and

potentially eliminate cancer cells in an antigen-specific manner and therefore convert immunologically “cold” tumors into “hot” tumors. We have previously published a phase II randomized clinical trial that compared autologous dendritic cells (ADC) vaccination plus best supportive care (BSC) with a median PFS of 2.7 months and 6.2 months median OS vs BSC with a median PFS of 2.3 months and a 4.7 months median OS in pre-treated mCRC patients. Although no statistically differences in survival between both arms were observed, ADC-treated patients generated a tumor-specific immune response and ADC therapy was tolerated well [10]. Recently oncolytic vaccines [11] and nanoparticles with tumor whole-cell lysate [12] combined with PD-L1 blockade has shown CD8 T cell activation and pre-clinical efficacy in colorectal cancer models.

Here we have designed a Phase I/II multicenter trial, with translational sub-studies, to evaluate the safety, pharmacodynamics and anti-tumor effects of Avelumab (anti-PD-L1) plus ADC vaccine in heavily pre-treated MSS mCRC patients.

Methods

Study design

This was a single arm Phase I/II multicentric study, with translational sub-study, of Avelumab (anti-PD-L1) plus autologous dendritic cell (ADC) vaccine in mismatch repair-proficient (MSS) metastatic colorectal cancer patients previously treated with at least 2 chemotherapy regimens. The study was conducted by the Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo (GEMCAD) and was registered on ClinicalTrials.gov (NCT03152565). Merck provided the Avelumab. Subjects underwent follow up visits weekly during the first month of treatment and every 2 weeks thereafter. Tumor response evaluation [through the revised response evaluation criteria in solid tumors (RECIST 1.1)], was assessed every 8 weeks (2 months) until disease progression. Toxicity was recorded on every visit using last version of NCI-CTCAE-V 4.03criteria.

Eligibility for inclusion included patients aged ≥ 18, histologically diagnosed MSS colorectal adenocarcinoma, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) 0 or 1, measurable disease by RECIST.1.1 criteria and a maximum lactate dehydrogenase level (LDH) level of > 1.5 upper limit normal (ULN) (ULN < 234 U/ml) centrally evaluated at Hospital Clínic Barcelona. Standard parameters for adequate liver, hematological and renal function were mandatory. Patients were required to show progression of metastatic cancer after receiving at least two chemotherapy regimens, with or without targeted therapies. All patients enrolled had signed an informed consent document

approved by the investigator's Institutional Review Board (IRB)/Independent Ethics Committee (IEC). The exclusion criteria included presence of brain metastases, prior organ transplantation, presence of clinical ascites, a modified Charlson index (except for cancer) score > 2, significant infections (acute or chronic), active autoimmune diseases, pregnancy, lactation, positive serological determination of HIV, HBV or HCV, unwillingness to use effective contraception during the trial, a history of other tumors.

This 3 + 3 phase I-II dose de-escalation trial was open to patients with advanced metastatic MSS colorectal cancer patients. Level 1: Avelumab 10 mg/kg biweekly until disease progression or unacceptable toxicity plus 10×10^6 cells of ADC vaccines biweekly for 5 infusions followed by up to 6 infusions every 6 months. If none of the first 3 patients experienced a dose limiting toxicity (DLT) this dose was recommended for phase 2. If 1/3 patients experienced a DLT, 3 more patients were recruited. If < 2/6 limiting toxicities observed, this dose will be recommended for phase 2. If 2/3 or 2/6 patients experienced a DLT, cohort -1 was opened. Level -1: Avelumab 3 mg/kg biweekly until disease progression or unacceptable toxicity + 10×10^6 ADC vaccines biweekly for 5 infusions followed by up to 6 infusions every 6 months. Patients received the combination therapy as follows: a dose of intradermal ADC vaccine (10×10^6 cells/dose) at days 1, 14, 28, 42 and 56 (total of 5 doses), and thereafter every 6 months until disease progression (maximum of 6 additional doses) or unacceptable toxicity; Avelumab was administered intravenously at a dose of 10 mg per kilogram of body weight, every 14 days until disease progression or unacceptable toxicity.

For the production of the ADC vaccine (approved by Spanish regulatory agency AEMPS; and NCT01413295, patients underwent aphaeresis to obtain peripheral blood leucocytes (60 mL total volume, $> 5 \times 10^9$ mononuclear cells). Autologous monocytes were selected by adherence to culture flasks and then differentiated to DCs by culturing adherent monocytes for 7 days in X-VIVO 15 (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 2% autologous serum, 800 U/mL GM-CSF (Miltenyi Biotech) and 500 U/mL IL-4 (Miltenyi Biotech) and then for an additional 24 h in the presence of 20 ng/mL tumor necrosis factor- α (Miltenyi Biotech), 10 ng/mL IL-1- β (Miltenyi Biotech), 20 ng/mL IL-6 (Miltenyi Biotech), 1 μ g/mL prostaglandin E2 (Dinoprostona; Pfizer, New York, USA), 20 μ g/mL poly (I:C) (Hiltonol; Oncovir Inc, Washington DC, USA) and autologous tumor lysate, using good manufacturing practices standard procedures. Maturation was confirmed by immunophenotyping. Release criteria included > 80% CD80+, CD83+, CD86+, HLA-DR+, absence of T lymphocytes (CD3+) and monocytes (CD14) (less than 15% CD14, CD3 and CD19 positive cells) and negative microbial test (bacterial, fungi, mycoplasma). Tumor biopsies to generate tumor

lysates for ADC vaccine were obtained from colonoscopy samples ($n=5$) or accessible metastases (liver $n=10$, lung $n=2$, peritoneum $n=1$, lymph node $n=1$), before study entry. To obtain the lysates, tumors were first washed twice for 30 min with RPMI 1640 (Lonza) supplemented with an antibiotic-antimitotic (100 IU/mL penicillin 100 μ g/mL streptomycin and 250 ng/mL amphotericin B, Gibco, Life Technologies Limited, UK) and then disrupted with a GentleMACS dissociator device (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) in RPMI 1640, DNase I (0,1 mg/mL) and collagenase IV (1 mg/mL), followed by freezing/thawing (five cycles), 25 KGy irradiation by cobalt-60, and subsequently cryopreserved at -80°C until needed for the preparation of DCs. Each vial containing 10×10^6 of ADC plus matured DCs. Upregulation of costimulatory molecules was confirmed in mature DCs (data not included) accordingly to established parameters.

Translational studies

Tumor biopsies from primary tumor or metastases in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) were obtained before study entry, for MSS, *RAS* and *BRAF* status. Then after 2 months of therapy, a new biopsy was done to evaluate pharmacodynamics changes. Tumor biopsies to generate tumor lysates for ADC vaccine were obtained from colonoscopy ($n=5$) or accessible metastases (liver $n=10$, lung $n=2$, peritoneum $n=1$, lymph node $n=1$), before study entry. In 6 cases liver biopsies were done in one center at 2 months post-therapy, to evaluate pharmacodynamic changes after combined therapy. The amount of biopsy obtained in each patient was 0.4 mm³. 50 mL of peripheral blood samples (40 mL for PBMCs isolation and 10 mL for serum determination of cytokines) were collected initially and at 2 months to evaluate the immune response.

Tumor specific T cell response

To determine the effect of the combination therapy in the immune response against tumor, the presence of the tumor-specific T cells was analyzed by cell proliferation, before and after treatment, using the autologous tumor mixed leucocyte reaction (ATMLR) on available patients ($n=7$). The supernatant of ATLMR was also analyzed to check the presence of inflammatory (IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. Autologous DCs and PBMCs (days 0 and 56) of each patient were thawed and co-cultured (5×10^3 DCs and 1×10^5 PBMCs, triplicates of each condition) in 0.2 ml X-VIVO 15 (Lonza) in 96-well round-bottom culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). To evaluate the synergy of the combination therapy, DCs (pulsed with and without autologous tumor lysate) and avelumab effect on

PBMCs was assessed individually and jointly. Plates were incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C for 7 days. Eighteen hours before termination of culture, supernatant was harvested for cytokine analysis and each well received 0.5 mCi of [methyl-³H] thymidine at 2 Ci/mmol (TRA310; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Uptake of thymidine into DNA was determined using a cell harvester (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) involving filtration of lysed cells onto 96-well filter plates (PHDTM cell harvester; Cambridge Tec, Cambridge, MA, USA) and addition of scintillation to each well followed by counting in a TopCount. Levels of cytokines on co-cultured supernatants were analyzed using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits from Invitrogen ThermoFisher Scientific, following manufacturer instructions.

Flow cytometry

Immune phenotyping was performed in available patients ($n = 12$), on PBMCs from samples obtained pre- (day 0) and post- (day 56) treatment by Histopaque gradient centrifugation (Lonza). Staining with anti-human monoclonal antibodies (CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CTLA4, PD1, CCR7, CD62L, CD45RA, CD45RO) was performed and analyzed on an Attune Nxt Flow Cytometer (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Details of the flow cytometry panels are shown in Supplementary Table 1.

Cytokines

Levels of 16 cytokines in serum samples obtained pre- (day 0) and post- (day 56) treatment were determined on available patients ($n = 16$). Simultaneous measurement of Stromal cell-derived factor 1, (CXCL12), interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 17A (IL-17a), interleukin 23 (IL-23), interferon gamma (IFN γ), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1, also known as chemokine (C-C motif) ligand 2-CCL2), Fas ligand (FasL or CD95L), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES, also known as Chemokine (C-C motif) ligand 5-CCL5) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) was analyzed using the ProcartaPlex assay with LuminexTM xMAP technology (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Concentrations of vascular endothelial growth factor B (VEGF-B), vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and transforming growth factor β -3 (TGF β 3) were monitored using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits from Wuhan Fine Biotech CO., Ltd and Invitrogen ThermoFisher Scientific.

RNA-seq: immune-metabolic signatures

RNA was isolated from tumor biopsies in 20 of 25 cases. 4 of 19 cases could not be analyzed basally because of poor RNA quality. Six patients were analyzed after 2 months of therapy, only 5 patients were informative for both biopsies. Quality control was performed with the FASTQ software. Adapter sequences were removed with FASTP. The STAR package was used to map to sequences to the GRCh38 assembly from Ensembl and obtain the number of reads per gene. Gene expression was normalized using the variance stabilizing transformation implemented into the DESeq2 package for R. We used the normalized gene expression data to analyze two signatures. First, a previously published T cell inflamed gene expression profile (GEP) was used with a cut-off below the top tertile of data [13]. Second, a neural network was applied to infer the enrichment of the experimental data in an in-house generated 10-gene signature (IMMECOLS) that discriminates patients across tumor types into 3 distinct immune-metabolic Clusters. [9].

Efficacy assessments

Following the baseline assessment, subsequent tumor assessments according to RECIST were performed systematically every 8 weeks (± 1 week) using CT scan, physical examination and PCR, albumin, CEA and LDH blood analysis, until disease progression relative to the date of inclusion. RECIST 1.1 criteria were used to assess patient response to treatment by determining progression-free survival (PFS) times, categorization objective tumor response as: complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progression of disease (PD), hyper-progressive disease (HPD) and not evaluable (NE). Due to the lack of consensus regarding HPD criteria, and considering the criteria described by previous authors [14] our multidisciplinary team defined HPD with the 4 following criteria: (a) progressive disease at first evaluation (8 weeks after inclusion); (b) increase of > 50% of size in target lesions between baseline and first radiological evaluation; (c) LDH levels increment > 2ULN; (d) decrease in ECOG PS > 2 (e.g., from ECOG PS 0 to ECOG PS > 2 or from ECOG PS 1 to PS > 3) during the first 8 weeks of treatment. Patients who fulfilled at least three of the aforementioned criteria were defined as exhibiting HPD, while patients who accomplish less than three criteria were considered as PD.

Statistical analysis

We planned to recruit 33 patients to detect an increase of 20% on 6-month PFS. Because an interim analysis recommended early termination for failing to reach the primary endpoint increasing % of PFS, a total of 19 patients were treated with

Avelumab and ADC vaccine. PFS and OS were analyzed by Kaplan–Meier curves and compared with a stratified log-rank test. We fitted Cox regression modeling for OS and PFS. Analysis was performed with the R statistical software. For comparisons, unpaired Student's t-tests or Mann–Whitney U tests were performed. Calculations were made using the Prism software (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

Results

Patient characteristics

Nineteen patients were enrolled and treated between April 2018 and January 2019 at 5 Spanish centers. Demographic data are listed in Supplementary Table 1. Of 28 patients screened, 9 were not eligible for the study (3 due to poor ECOG PS, 4 due to LDH > 1.5ULN, 1 due to brain metastases in the screening period and 1 because aphaeresis was not feasible). The median number of prior therapies was 3 (range 2–5). *Median time since metastatic diagnoses to study entry was 41.7 months, range (18.4–83 months)*. All patients had previously received irinotecan, oxaliplatin and fluoropyrimidines, 14 (74%) had received antiangiogenic agents (11 patients Bevacizumab and 3 patients Aflibercept), 10 (53%) anti-EGFR agents (6 Panitumumab and 4 Cetuximab), 2 patients Regorafenib and 2 patients TAS 102. Genomic and transcriptomic baseline characteristics are listed in Table 1.

Safety

Median time from the apheresis and first dose of DC vaccine was 14 days (standard deviation 7.8). Patients did not receive oncologic therapy in the meantime. Three patients were entered in phase I at dose level 1. Because there were no dose-limiting toxicities in the first 3 patients Avelumab (standard dose) was administered with ADC in the rest of patients. The treatment administration was well tolerated, with no grade 3–4 toxicities. The most frequent adverse events were fatigue, diarrhea and flu-like symptoms (see Table 2).

Efficacy

One patient was not restaged due to rapidly clinical deterioration. Eighteen patients were evaluable for treatment response. No objective responses were observed. Four patients achieved stable disease (22%), four (22%) experienced hyper progressive disease (HPD) and ten (56%) had progressive disease. The median progression-free survival was 3.1 months [2.1 – 5.3 months] and overall survival was 12.2 months [3.2 – 23.2 months]. An interim analysis (Simon design first-stage) recommended early study termination, because 2/19 patients (11%) were disease free at 6 months. Thirteen patients received additional treatments after disease progression.

Table 1 Patient biologic characteristics and treatment efficacy

Patient	RAS	BRAF	GEP	IMMETCOLS	BOR	Survival (months)
01–001	Wild-type	Wild-type	Not evaluated	Not evaluated	SD	DOD (19)
01–003	Wild-type	V600E	High	3	HPD	DOD (4)
01–004	Wild-type	Wild-type	Low	3	HPD	DOD (4)
01–007	Wild-type	Wild-type	High	3	PD	DOD (15)
01–008	Wild-type	Wild-type	Not evaluated	Not evaluated	SD	AWD (23+)
01–009	G12V	Wild-type	Low	3	PD	DOD (18)
01–011	Wild-type	Wild-type	Low	3	SD	DOD (10)
01–012	Wild-type	Wild-type	High	1	PD	DOD (20)
02–002	G12V	Wild-type	Low	1	PD	DOD (17)
02–003	Mutant*	Wild-type	Low	3	HPD	DOD (5)
02–005	G12V	Wild-type	Low	3	PD	DOD (12)
04–001	Wild-type	Wild-type	High	3	PD	DOD (14)
05–001	G12A	Wild-type	High	3	PD	DOD (11)
05–002	Wild-type	Wild-type	Low	1	HPD	DOD (9)
05–004	G13D	Wild-type	Low	3	PD	DOD (21)
05–005	G12A	Wild-type	Not evaluated	Not evaluated	PD	DOD (9)
05–006	G12D	Wild-type	Not evaluated	Not evaluated	SD	DOD (15)
09–001	G12S	Wild-type	High	3	PD	DOD (6)
09–002	Mutant*	Wild-type	Low	3	NE	DOD (3)

Bold values indicate patients with hyper-progressive disease

HPD Hyper-progressive disease

*not specified RAS mutation

Table 2 Adverse events, associated with treatment with avelumab and ADCV

Type of toxicity	Grade 1–2 (%)	Grade 3–4 (%)
Fatigue	3 (16)	1 (5)
Fever	3 (16)	0 (0)
Vomiting	3 (16)	1 (5)
Anorexia	3 (16)	0 (0)
Diarrhea	2 (10)	1 (5)
Arthralgia	2 (10)	0 (0)
Pruritus	2 (10)	0 (0)
Rash	1 (5)	0 (0)
Flu-like symptoms	1 (5)	0 (0)
Anemia	1 (5)	0 (0)
Increased AST	1 (5)	0 (0)
Increased ALT	1 (5)	0 (0)
Hypothyroidism	1 (5)	0 (0)
Stomatitis	1 (5)	0 (0)
Myalgia	1 (5)	0 (0)
Pneumonitis	1 (5)	0 (0)

Translational studies

In vitro study

An increased of tumor-specific T cell proliferation was observed in post-treatment samples after the co-culture of PBMCs with DCs pulsed lysate but not with the PBMCs and the anti-PD-L1 therapy alone. (Supplementary Fig. 6). Levels of inflammatory cytokines (IFN- γ) were also increased after treatment. No increased levels of anti-inflammatory (IL-10) cytokines were observed (Supplementary Fig. 7).

Cytokine monitoring

The changes in concentrations of 7 of the cytokines analyzed comparing each patient baseline serum with that obtained at day 56 after treatment are illustrated in Supplementary Figs. 1, 2 and 3 and Fig. 1c.

Lymphocytic populations

To monitor immune activity in peripheral blood, we analyzed by flow cytometry different lymphocyte sub-populations in the PBMCs of 11 patients before and 56 days after receiving the combination therapy. Proportions of (CD62L⁺CCR7⁺CD45RA⁺CD45RO⁻), effector

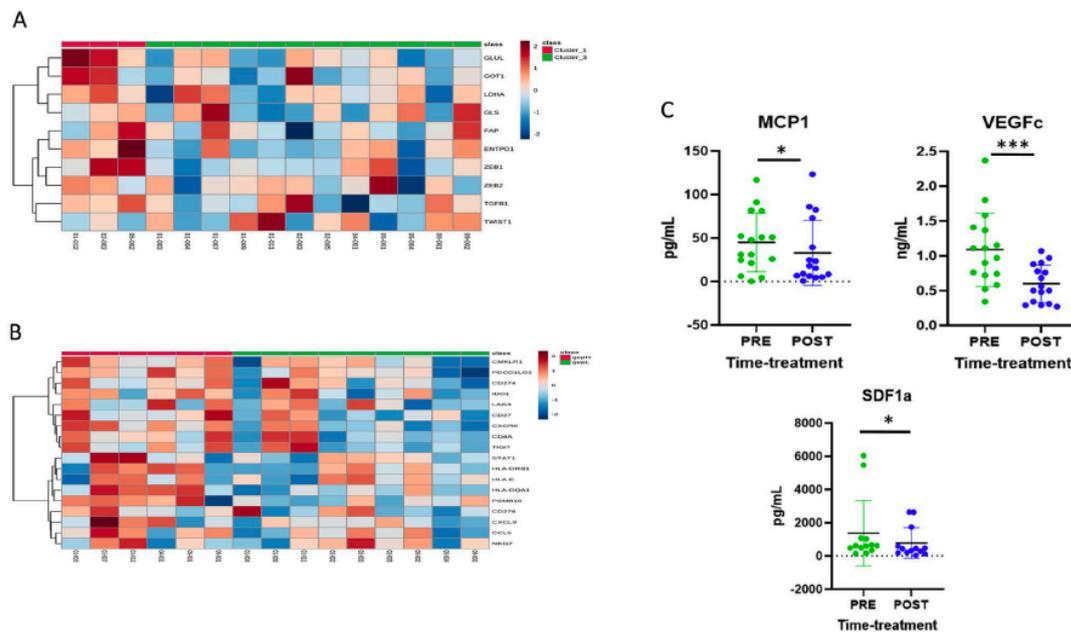


Fig. 1 1A. Immune-metabolic signature (IMMETCOLS) baseline expression. 1B. Gene expression pro-immune signature (GEP) baseline expression 1C. Changes in concentrations of cytokines comparing each patient baseline serum with that obtained at day 56 after

(CD62L⁻CCR7⁻CD45RA⁺CD45RO⁻), stem memory (CD62L⁺CCR7⁺CD45RA⁺CD45RO⁺), central memory (CD62L⁺CCR7⁺CD45RA⁻CD45RO⁺), effector memory (CD62L⁻CCR7⁻CD45RA⁻CD45RO⁺) and regulatory (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) T cells were evaluated, as well as the expression of PD1 and CTLA-4 on CD4 and CD8 T cells. This analysis did not reveal any evidence for significant variations in T cell subsets (Supplementary Figs. 4 and 5). We did not find correlations between different clinical outcomes and the immune subpopulations in peripheral blood (data not shown).

RNA immune-signatures

To evaluate if treatment efficacy was related to previously published pro-immune signatures (GEP) or to our recently published immune-metabolic signature (IMMETCOLS), we analyzed the baseline expression of both signatures (Fig. 1a and b). The IMMETCOLS signature classifies patients into 3 distinct metabolic Clusters and was cross-validated in the training set. Cluster 1 tumors show enhanced glycolysis, hexosamine biosynthesis pathway, macropinocytosis and branched chain ketoacids (BCKA) synthesis. Cluster 1 is enriched in fibroblast and EMT markers, pro-immune signatures (GEP, PD-L1 and PD1) and also exhausted CD8 + T cells. Concomitant

up-regulation of HIF-1a and specific isoforms of enzymes/transporters, suggest that the observed metabolic fingerprint may be mediated by a hypoxic and glutamine deprived tumor microenvironment with a high content of immune infiltrates that facilitate the metabolic crosstalk with cancer cells. Cluster 2 has enhanced glutamine/BCKA oxidation and gain of gluconeogenic/glycogenic ability which are needed for glucose-independent survival and up-regulated enzymes in lipids b-oxidation and glutamine synthesis. Finally, Cluster 3 is characterized by up-regulation of SLC1A5 and SLC7A5 that promotes cancer cell dependence on glucose and increases the need of cytosolic NADPH sustained by concomitant up-regulation of G6PD. Its metabolic signature also suggests the up-regulation of proline, one-carbon metabolism and key players of malate-aspartate shuttle, suggestive of a gain of reductive carboxylation ability. Of 15 patients suitable for analysis, 12 (80%) were assigned to IMMETCOLS Cluster 3 and 3 patients to Cluster 1 (20%). No patient was assigned to Cluster 2. This distribution differs from that found in untreated patients (35% in Cluster 1, 15% in Cluster 2 and 50% in Cluster 3) we also evaluated association of both signatures with response rate, PFS or OS. No significant correlation was found between these signatures and each of these end-points (Fig. 2).

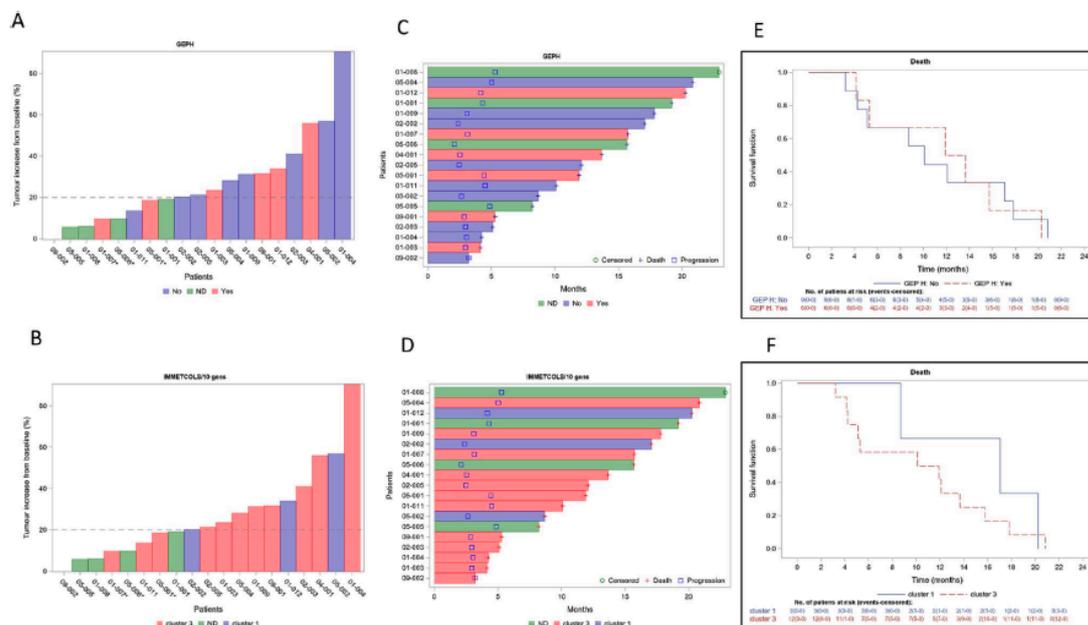


Fig. 2 Correlation of both signatures GEP and IMMETCOLS with response rate (2A and 2B), progression free survival or overall survival (2C, 2D). 2E and 2F. Kaplan–Meier curves for overall survival with GEP and IMMETCOLS signatures

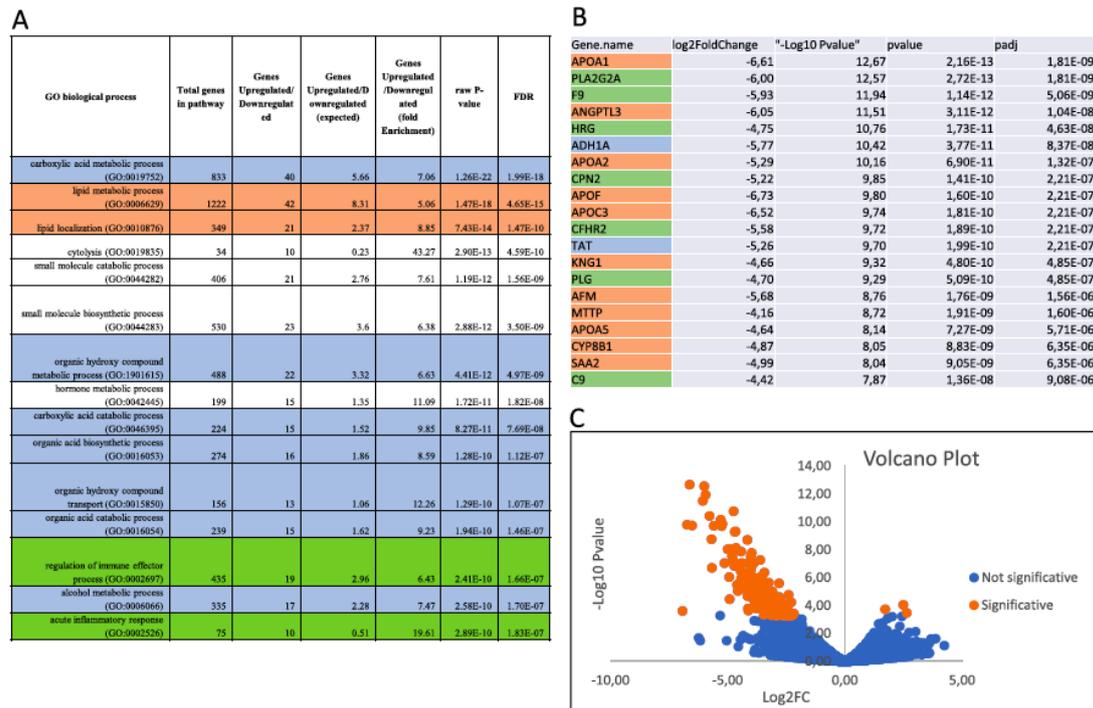


Fig. 4 A total of 143 genes significantly changed between pre and post-therapy samples. 4A. More critically GO biological processes changed before and after therapy. 4B. Top 20 genes down-regulated in post-therapy samples compared with pre-therapy samples. 4C. Volcano plot

to be included in trials like AVEVAC study, that included patients with good ECOG performance status that have received at least 2 lines of therapy. In addition, the safety profile with the combination of avelumab and DC vaccine do not differ with single agent therapies separately [5, 10]. We cannot rule out, that because we use a stringent inclusion criterium (pe. patients with LDH > 1.5ULN were excluded), intrinsic tumor characteristics instead of treatment efficacy, would influence on survival.

The rationale for combining vaccines with ICB came from extensive pre-clinical research, that elegantly demonstrated that immunologically cold tumors, generated from the murine colorectal cell lines MC38 and CT26, acquired a hot phenotype after various vaccination approaches [11, 12]. It should be emphasized that these two murine models show a much higher tumor mutational burden (TMB) than MSS colorectal cancer patients or mouse colorectal tumor organoid models [18]. Because of scarcity of clinical data addressing whether vaccines could increase antigen presentation in mCRC, we have taken several approaches to address this important issue with different approaches. First, we did a pre-clinical study that shows that the co-culture of PBMCs with DCs pulsed lysate but not with the PBMCs

and the anti-PD-L1 therapy increased T cell proliferation and IFN γ . Second, by analyzing circulating cytokine levels, we have found that, while CCL5, TGF β and MMP9 did not display significant variations after therapy, CCL2 and SDF1a indeed showed decreased levels. Interestingly, the only long-term survivor patient showed a > 240 fold-increase of CCL5 levels post-therapy. Third, the numbers of peripheral blood CD8 effector T cells and CD8⁺PD1⁺ blood cells did not show significant variations after therapy. Finally, the pro-immune GEP signature did not show significant gains in post-therapy tumor tissue liver samples compared with pre-therapy samples. All these translational data, fail to support at least clinically, a strategy to use ADC vaccines in order to inflame immunological “cold” tumors.

Hyper-progressive disease (HPD) was seen in 4/18 (22%) cases and it was of special concern because we did not observe this type of progression in our previous randomized ADC study [10], in spite of a better clinical profile of patients included in the current study (ECOG PS of 0,1 and without poor biological features (basal LDH < 1.5ULN)). We have seen HPD in IMMETCOLS Cluster 1 patients, whose tumor displays characteristics of a mesenchymal phenotypes (1/3) (33%) but also in patients classified as

Cluster 3, with epithelial phenotypes (3/12) (25%). HPD has been extensively described in mesenchymal tumors which are usually enriched with M2- polarized, macrophages and Tregs [19, 20]. Fully humanized monoclonal antibodies such as Avelumab, have been found to exert at least part or their antitumor activity through IgG1 antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) [21]. However, impaired antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) due to M2 polarization, a recently described mechanism of resistance, probably also contributes to immunosuppression in Cluster 1 [22, 23]. We were surprised that HPD occurred also in Cluster 3 patients, characterized by an epithelial-glycolytic phenotype endowed with a reductive carboxylation ability, with M1-polarized macrophage infiltration.

Metabolic competition between cancer cells and tumor microenvironment are tightly intertwined with increased aerobic glycolysis and glutamine consumption [24–26]. Nevertheless, in our analysis of pre- and post-therapy metastatic samples, the most significantly de-regulated genes were related to lipid metabolism and transport. Interestingly, many of the genes down-regulated post-therapy (APOA1, APOH, APOC3, PLG, SERPINC1, C9, ANGPTL3, CFHR5) have been found specifically associated with colorectal liver metastases, suggesting that the observed changes are clinically meaningful [27, 28]. Importantly, some of the lipid metabolism and inflammation genes that we found down-regulated in post-therapy samples play an important role in

tumor control and immunomodulation [29–33] and protection from oxidative stress [34, 35]. We speculate that CRC tumors treated with Avelumab and ADC downregulate APOA1 and CCL16, among other genes, but preserve their viability despite increased oxidative stress, thanks to the activation of compensatory reductive pathways (such as pentose phosphate, malic enzyme or isocitrate dehydrogenases). Indeed, these pathways are upregulated in IMMETCOLS Cluster 3. It has been previously described that colorectal liver cancer cells use cholesterol and poly-unsaturated fatty acids to promote ROS and cancer progression [37, 38]. Metabolic rewiring after glutaminase inhibition, with lipid consumption instead of glutamine uptake, has been described pre-clinically [39]. However, to our knowledge, the current study provides the first clinical evidence that a similar metabolic adaptation is also used by colorectal cancer cells after Avelumab and ADC therapy, to boost oxidative stress and contribute to cancer progression (Fig. 5). We propose that a two-pronged metabolic inhibition consisting in [1] to reduce glycolysis [40], glutamine or lipid supplies [41] in order to minimize oxidative stress and [2] or pentose phosphate inhibitors [42, 43] to minimize anti-oxidant defenses, merits consideration in combination with vaccines and ICB to achieve clinical efficacy.

We are aware that our study has several limitations. First, the number of recruited patients was small and second, the selected primary end-point (PFS instead of OS)

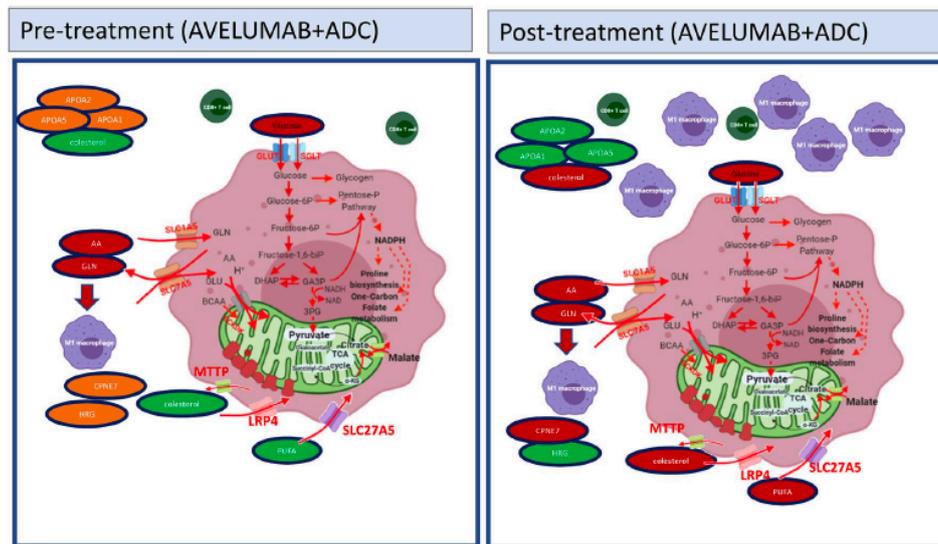


Fig. 5 Proposed metabolic rewiring (with lipid consumption instead of only glutamine and glucose feeding). This is the first clinical evidence that this metabolic adaptation is used by colorectal cancer cells, after avelumab and ADC therapy, to boost oxidative stress and

contribute to cancer progression. Oxidative stress is compensated in IMMETCOLS cluster 3 tumors with anti-oxidative pathways such as pentose-phosphate pathway

conveys a narrower scope in our observations. Third, the lack of enhanced PFS contrasts with a greater OS observed; this long-term survival effect may be explained due to the limitations of RECIST1.1 interpreting progressive disease in the presence of an immune response. We are also conscious that tumor biopsies are not the most desirable source of antigens in order to prepare a vaccine because of their high heterogenicity compared to synthetic peptides or neoantigens. Finally, the lack of significant post-therapy changes in peripheral blood CD8⁺ effector T cells numbers should not preclude future analyses of these and other immune populations in pre- and post-therapy tumor tissue biopsies. That said, our additional observations of lack of increased GEP scores observed in post-treatment samples suggests that the combined Avelumab plus ADC therapy may fail to boost the cytolytic efficacy of the immune environment in CRCs.

Conclusion and perspective

We have shown that the combination with Avelumab plus ADC vaccine is safe and well tolerated, although it exhibited modest clinical activity in unselected mCRC patients. Further, we describe that this therapy induces a previously unreported metabolic rewiring after ICB and ADC in mCRC which may represent a novel immunotherapy-induced tumor vulnerability. We advocate for new therapeutic strategies, including ICB in combination with nanoparticles vaccines or oncolytic virus, to increase antigen presentation along with drugs that target specific metabolic dependences, in selected groups of MSS mCRC patients based on immune-metabolic signatures such as IMMETCOLS, in prospective clinical trials.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03283-5>.

Acknowledgements Not applicable.

Authors' contributions Conceptualization: DB-R and JM. Article writing and editing: ME-R, MC, DB-R, JM. Supervision: DB-R. All authors read and approved the final manuscript.

Funding The study was funded by grants from the FIS PI17/00732 from Instituto de Salud Carlos III, Premi Fi de Residència Emili Letang from Hospital Clínic Barcelona, Plan Nacional de I + D (PID-107139RB-C21 to DB-R and PID2020-115051RB-I00 to MC) and Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo (GEMCAD). The study was funded with Grants from Catalan Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) (2014-SGR-474, 2017-SGR-1174 and 2017-SGR-1033), Fundació la Marató de TV3 (201330.10), Instituto de Salud Carlos III (PI13/01728 and PI19/00740) and Fundacion Olga Torres (Modalitat A. 2019/2020) to JM. IMMETCOLS signature is under patent protection (EP21382772.8.)

This research was financially supported by GEMCAD and (OR Avelumab was provided) by Merck, S.L.U., Madrid, Spain, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany, as part of an alliance between the

healthcare business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany (CrossRef Funder ID: <https://doi.org/10.13039/100009945>) and Pfizer.

Declarations

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval and Consent to participate All patients enrolled signed an informed consent document approved by the investigator's Institutional Review Board (IRB)/Independent Ethics Committee (IEC).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, Lopez-Yurda M, Grootscholten C, Beets GL, Snaebjornsson P, Maas M, Mertz M, Veninga V, Bounova G, Broeks A, Beets-Tan RG, de Wijkerslooth TR, van Lent AU, Marsman HA, Nuijten E, Kok NF, Kuiper M, Verbeek WH, Kok M, Van Leerdam ME, Schumacher TN, Voest EE, Haanen JB (2020) Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med* 26(4):566–576
- Lenz HJ, Van Cutsem E, Luisa Limon M, Wong KYM, Hendlisz A, Aglietta M, García-Alfonso P, Neyns B, Luppi G, Cardin DB, Dragovich T, Shah U, Abdullaev S, Gricar J, Ledezne JM, Overman MJ (2022) First-line nivolumab plus low-dose ipilimumab for microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: the phase II checkMate 142 study. *J Clin Oncol* 40(2):161–170
- Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, El Dika IH, Segal N, Shcherba M, Sugarman R, Stadler Z, Yaeger R, Smith JJ, Rousseau B, Argiles G, Patel M, Desai A, Saltz LB, Widmar M, Iyer K, Zhang J, Gianino N, Crane C, Romesser PB, Pappou EP, Paty P, Garcia-Aguilar J, Gonen M, Gollub M, Weiser MR, Schalper KA, Diaz LA Jr (2022) PD-1 blockade in mismatch repair-deficient locally advanced rectal cancer. *N Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2201445>
- André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, de la Fouchardiere C, Rivera F, Elez E, Bendell J, Le DT, Yoshino T, Van Cutsem E, Yang P, Farooqui MZH, Marinello P, Diaz LA Jr (2020) KEYNOTE-177 investigators. Pembrolizumab in microsatellite-Instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 383(23):2207–2218

5. Le DT et al (2015) PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372(26):2509–2520. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1500596>
6. Herbst RS et al (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528):563–567. <https://doi.org/10.1038/nature14011>
7. Paré L, Pascual T, Seguí E, et al (2018) Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer-types. *Ann Oncol*
8. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L et al (2016) Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* 165:35–38
9. Pedrosa L, Foguet C, Oliveres H, et al (2021) An immune-metabolic signature, correlates with different immune-suppressive patterns across tumor types. *Ann Oncol*, 996P
10. Caballero-Baños M, Benitez-Ribas D, Tabera J, Varea S, Vilana R, Bianchi L, Ayuso JR, Pagés M, Carrera G, Cuatrecasas M, Martin-Richard M, Cid J, Lozano M, Castells A, García-Albéniz X, Maurel J, Vilella R (2016) Phase II randomised trial of autologous tumour lysate dendritic cell plus best supportive care compared with best supportive care in pre-treated advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 64:167–174
11. Liu Z, Ravindranathan R, Kalinski P, Guo ZS, Bartlett DL (2017) Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy. *Nat Commun.* 8:14754
12. HeBe C, Kollenda S, Rotan O, Pastille E, Adamczyk A, Wenzek C, Hansen W, Epple M, Buer J, Westendorf AM, Knuschke TA (2019) Tumor-peptide-based nanoparticle vaccine elicits efficient tumor growth control in antitumor immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 18(6):1069–1080
13. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, Sher X, Liu XQ, Lu H, Nebozhyn M, Zhang C, Lunceford JK, Joe A, Cheng J, Webber AL, Ibrahim N, Plimack ER, Ott PA, Seiwert TY, Ribas A, McClanahan TK, Tomassini JE, Loboda A, Kaufman D (2018) Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science.* 362(6411):3593
14. Champiat S, Derclé L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, Chapat N, Eggermont A, Marabelle A, Soria JC, Ferte C (2017) Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res* 23(8):1920–1928
15. Yarchoan M, Huang CY, Zhu Q, Ferguson AK, Durham JN, Anders RA, Thompson ED, Rozich NS, Thomas DL 2nd, Nauroth JM, Rodriguez C, Osipov A, De Jesus-Acosta A, Le DT, Murphy AG, Laheru D, Donehower RC, Jaffee EM, Zheng L (2020) Azad NSA phase 2 study of GVAX colon vaccine with cyclophosphamide and pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient advanced colorectal cancer. *Cancer Med* 9(4):1485–1494
16. Cousin S, Cantarel C, Guegan JP, Gomez-Roca C, Metges JP, Adenis A, Pernot S, Bellera C, Kind M, Auzanneau C, Le Loarer F, Soubeyran I, Bessedé A, Italiano AR-A (2021) Combination in patients with microsatellite stable colorectal cancer (REGO-MUNE): a single-arm, open-label. Phase II Trial. *Clin Cancer Res.* 27(8):2139–2147
17. Martinelli E, Martini G, Famiglietti V, Troiani N, Napolitano S, Pietrantonio F, Ciardiello D, Terminiello M, Borrelli C, Vitiello PP, De Braud F, Morano F, Avallone A, Normanno N, Nappi A, Maiello E, Latiano T, Falcone A, Cremolini C, Rossini D, Santabarbara G, Pinto C, Santini D, Cardone C, Zanaletti N, Di Liello A, Renato D, Esposito L, Marrone F, Ciardiello F (2021) Cetuximab rechalleng plus Avelumab in pretreated patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: the phase 2 single-arm clinical CAVE trial. *JAMA Oncol.* 7(10):1529–1535
18. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llgero A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, Ibiza S, Cañellas A, Hernando-Mombalona X, Byrom D, Matarin JA, Calon A, Rivas EI, Nebreda AR, Riera A, Attolini CS, Batlle E (2018) TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* 554(7693):538–543
19. Lo Russo G, Moro M, Sommariva M, Cancila V, Boeri M, Centonze G, Ferro S, Ganzinelli M, Gasparini P, Huber V, Milione M, Porcu L, Proto C, Pruneri G, Signorelli D, Sangaletti S, Sfondrini L, Storti C, Tassi E, Bardelli A, Marsoni S, Torri V, Tripodo C, Colombo MP, Anichini A, Rivoltini L, Balsari A, Sozzi G, Garassino MC (2019) Antibody-Fc/FcR interaction on macrophages as a mechanism for hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer subsequent to PD-1/PD-L1 blockade. *Clin Cancer Res* 25(3):989–999
20. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, Sato E, Fukuoka S, Tada Y, Tanaka A, Morikawa H, Kawazoe A, Kinoshita T, Shitara K, Sakaguchi S, Nishikawa H (2019) PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(20):9999–10008
21. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, Schlom J (2015) Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol Res* 3(10):1148–1157
22. Su S, Zhao J, Xing Y, Zhang X, Liu J, Ouyang Q, Chen J, Su F, Liu Q, Song E (2018) Immune checkpoint inhibition overcomes ADCP-induced immunosuppression by macrophages. *Cell* 175(2):442–457.e23
23. Cunha LD, Yang M, Carter R, Guy C, Harris L, Crawford JC, Quarato G, Boada-Romero E, Kalkavan H, Johnson MDL, Natarajan S, Turnis ME, Finkelstein D, Opferman JT, Gawad C, Green DR (2018) LC3-Associated phagocytosis in myeloid cells promotes tumor immune tolerance. *Cell* 175(2):429–441.e16
24. Chang CH, Qiu J, O’Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL (2015) Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell* 162(6):1229–1241
25. Wu WC, Sun HW, Chen J, Ouyang HY, Yu XJ, Chen HT, Shuang ZY, Shi M, Wang Z, Zheng L (2019) Immunosuppressive immature myeloid cell generation is controlled by glutamine metabolism in human cancer. *Cancer Immunol Res* 7(10):1605–1618
26. Reinfeld BI, Madden MZ, Wolf MM, Chytil A, Bader JE, Patterson AR, Sugiura A, Cohen AS, Ali A, Do BT, Muir A, Lewis CA, Hongo RA, Young KL, Brown RE, Todd VM, Huffstater T, Abraham A, O’Neil RT, Wilson MH, Xin F, Tantawy MN, Meryman WD, Johnson RW, Williams CS, Mason EF, Mason FM, Beckermann KE, Vander Heiden MG, Manning HC, Rathmell JC, Rathmell WK (2021) Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment. *Nature* 593(7858):282–288
27. Cheng J, Song X, Ao L, Chen R, Chi M, Guo Y, Zhang J, Li H, Zhao W, Guo Z, Wang X (2018) Shared liver-like transcriptional characteristics in liver metastases and corresponding primary colorectal tumors. *J Cancer.* 9(8):1500–1505
28. Zhang T, Guo J, Gu J, Wang Z, Wang G, Li H, Wang J (2019) Identifying the key genes and microRNAs in colorectal cancer liver metastasis by bioinformatics analysis and in vitro experiments. *Oncol Rep.* 41(1):279–291
29. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E, Costa S, Vinckier S, Dresselaer T, Åkerud P, De Mol M, Salomäki H, Phillipson M, Wynn S, Larsson E, Buyschaert I, Botling J, Himmelreich U, Van Ginderachter JA, De Palma M, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Carmeliet P (2011) HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 19(1):31–44

30. Zamanian-Daryoush M, Lindner D, Tallant TC, Wang Z, Buffa J, Klipfell E, Parker Y, Hatala D, Parsons-Wingter P, Rayman P, Yusufshaq MSS, Fisher EA, Smith JD, Finke J, DiDonato JA, Hazen SL (2013) The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects. *J Biol Chem* 288(29):21237–21252
31. Guo G, Wang Y, Zhou Y, Quan Q, Zhang Y, Wang H, Zhang B, Xia L (2019) Immune cell concentrations among the primary tumor microenvironment in colorectal cancer patients predicted by clinicopathologic characteristics and blood indexes. *J Immunother Cancer* 7(1):179
32. Sirmio P, Väyrynen JP, Klintrup K, Mäkelä J, Mäkinen MJ, Karttunen TJ (2017) Tuomisto a decreased serum apolipoprotein A1 levels are associated with poor survival and systemic inflammatory response in colorectal cancer. *Sci Rep* 7(1):5374
33. Tiwari A, Tashiro K, Dixit A, Soni A, Vogel K, Hall B, Shafiq I, Slaughter J, Param N, Le A, Saunders E, Paithane U, Garcia G, Campos AR, Zettervall J, Carlson M, Starr TK, Marahrens Y, Deshpande AJ, Commisso C, Provenzano PP, Bagchi A (2020) Loss of HIF1A from pancreatic cancer cells increases expression of PPP1R1B and degradation of p53 to promote invasion and metastasis. *Gastroenterology* 159(5):1882–1897
34. Ruscica M, Botta M, Ferri N, Giorgio E, Macchi C, Franceschini G, Magni P, Calabresi L, Gomarasci M (2018) High density lipoproteins inhibit oxidative stress-induced prostate cancer cell proliferation. *Sci Rep* 8(1):2236
35. Ganapathy E, Su F, Meriwether D, Devarajan A, Grijalva V, Gao F, Chattopadhyay A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST, Farias-Eisner R (2012) D-4F, an apoA-I mimetic peptide, inhibits proliferation and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by upregulating the antioxidant enzyme MnSOD. *Int J Cancer*. 130(5):1071–81
36. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich PY, Mendrzyk R, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, Pohla H, Stanczak JJ, Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Miki T, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Rammensee HG, Reinhardt C, Singh-Jasuja H (2012) Muropeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*. 18(8):1254–61
37. Gao Q, Zhang G, Zheng Y, Yang Y, Chen C, Xia J, Liang L, Lei C, Hu Y, Cai X, Zhang W, Tang H, Chen Y, Huang A, Wang K, Tang N (2020) SLC27A5 deficiency activates NRF2/TXNRP1 pathway by increased lipid peroxidation in HCC. *Cell Death Differ*. 27(3):1086–1104
38. Wang C, Li P, Xuan J, Zhu C, Liu J, Shan L, Du Q, Ren Y, Ye J (2017) Cholesterol enhances colorectal cancer progression via ROS elevation and MAPK signaling pathway activation. *Cell Physiol Biochem* 42(2):729–742
39. Reis LMD, Adamoski D, Ornitz Oliveira Souza R, Rodrigues Ascensão CF, Sousa de Oliveira KR, Corrêa-da-Silva F, de Sá Malta, Patroni F, Meira Dias M, Consonni SR, Mendes de Moraes-Vieira PM, Silber AM, Dias SMG (2019) Dual inhibition of glutaminase and carnitine palmitoyltransferase decreases growth and migration of glutaminase inhibition-resistant triple-negative breast cancer cells. *J Biol Chem*. 294(24):9342–9357
40. Koppula P, Olszewski K, Zhang Y, Kondiparthi L, Liu X, Lei G, Das M, Fang B, Poyurovsky MV, Gan B (2021) *KEAP1* deficiency drives glucose dependency and sensitizes lung cancer cells and tumors to GLUT inhibition. *iScience*. 24(6):10264941
41. Najumudeen AK, Ceteci F, Fey SK, Hamm G, Steven RT, Hall H, Nikula CJ, Dexter A, Murta T, Race AM, Sumpton D, Vlahov N, Gay DM, Knight JRP, Jackstadt R, Leach JDG, Ridgway RA, Johnson ER, Nixon C, Hedley A, Gilroy K, Clark W, Malla SB, Dunne PD, Rodríguez-Blanco G, Critchlow SE, Mrowinska A, Malviya G, Solovoyev D, Brown G, Lewis DY, Mackay GM, Strathdee D, Tardito S, Gottlieb E; CRUK Rosetta Grand Challenge Consortium, Takats Z, Barry ST, Goodwin RJA, Bunch J, Bushell M, Campbell AD, Sansom OJ (2021) The amino acid transporter SLC7A5 is required for efficient growth of KRAS-mutant colorectal cancer. *Nat Genet*. 53(1):16–26
42. Daneshmandi S, Cassel T, Lin P, Higashi RM, Wulf GM, Boussiotis VA, Fan TW, Seth P (2021) Blockade of 6-phosphogluconate dehydrogenase generates CD8(+) effector T cells with enhanced anti-tumor function. *Cell Rep* 34(10):108831
43. Luo M, Shang L, Brooks MD, Jiage E, Zhu Y, Buschhaus JM, Conley S, Fath MA, Davis A, Gheordunescu E, Wang Y, Harouaka R, Lozier A, Triner D, McDermott S, Merajver SD, Luker GD, Spitz DR, Wicha MS (2018) Targeting breast cancer stem cell state equilibrium through modulation of redox signaling. *Cell Metab* 28(1):69–86.e6

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Marta Español-Rego¹ · Carlos Fernández-Martos² · Elena Elez³ · Carles Foguet⁴ · Leire Pedrosa⁵ · Nuria Rodríguez⁶ · Ana Ruiz-Casado⁷ · Estela Pineda⁵ · Joan Cid⁸ · Raquel Cabezon¹ · Helena Oliveres⁵ · Miquel Lozano⁸ · Angels Ginés^{9,14} · Angeles García-Criado¹⁰ · Juan Ramon Ayuso¹⁰ · Mario Pagés¹⁰ · Miriam Cuatrecasas^{11,14} · Ferrán Torres¹² · Timothy Thomson^{13,14,15} · Marta Cascante^{4,14} · Daniel Benítez-Ribas¹ · Joan Maurel^{5,14}

Marta Español-Rego
espanol@clinic.cat

Carlos Fernández-Martos
carlosfmartos@institutooncologia.com

Elena Elez
meelez@vhio.net

Carles Foguet
cfoguet@ub.edu

Leire Pedrosa
LEPEDROSA@clinic.cat

Nuria Rodríguez
nuria.rodriguez@salud.madrid.org

Ana Ruiz-Casado
aruiz.hflr@salud.madrid.org

Estela Pineda
EPINEDA@clinic.cat

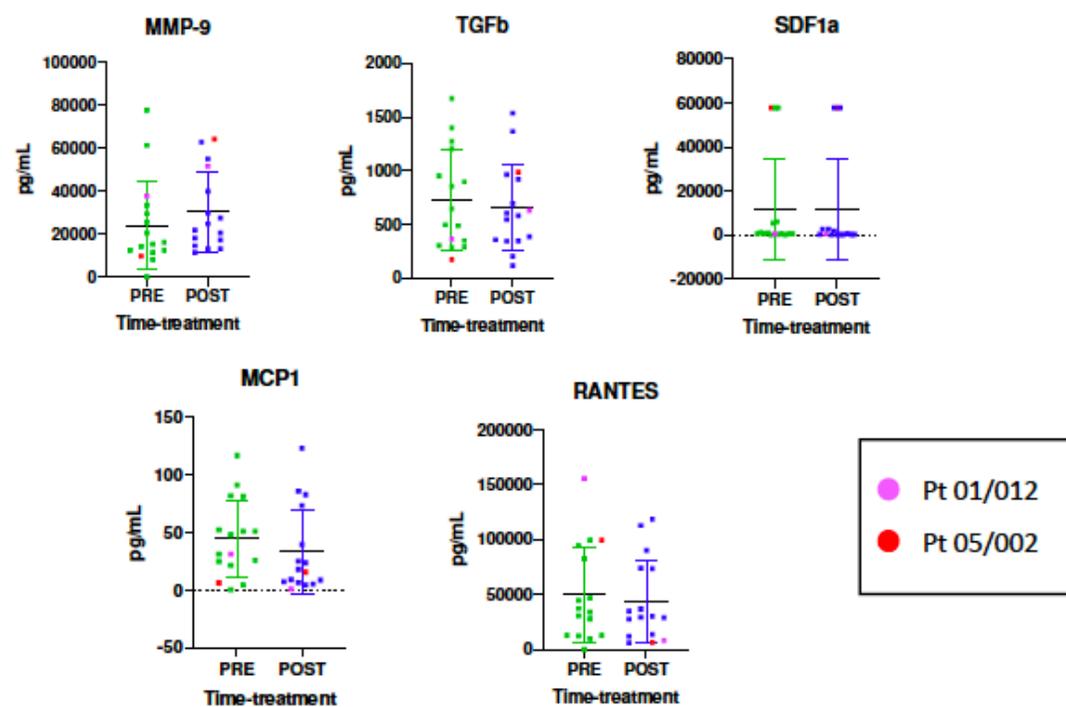
Joan Cid
jcid.hj23.ics@gencat.cat

Raquel Cabezon
LCABEZON@clinic.cat

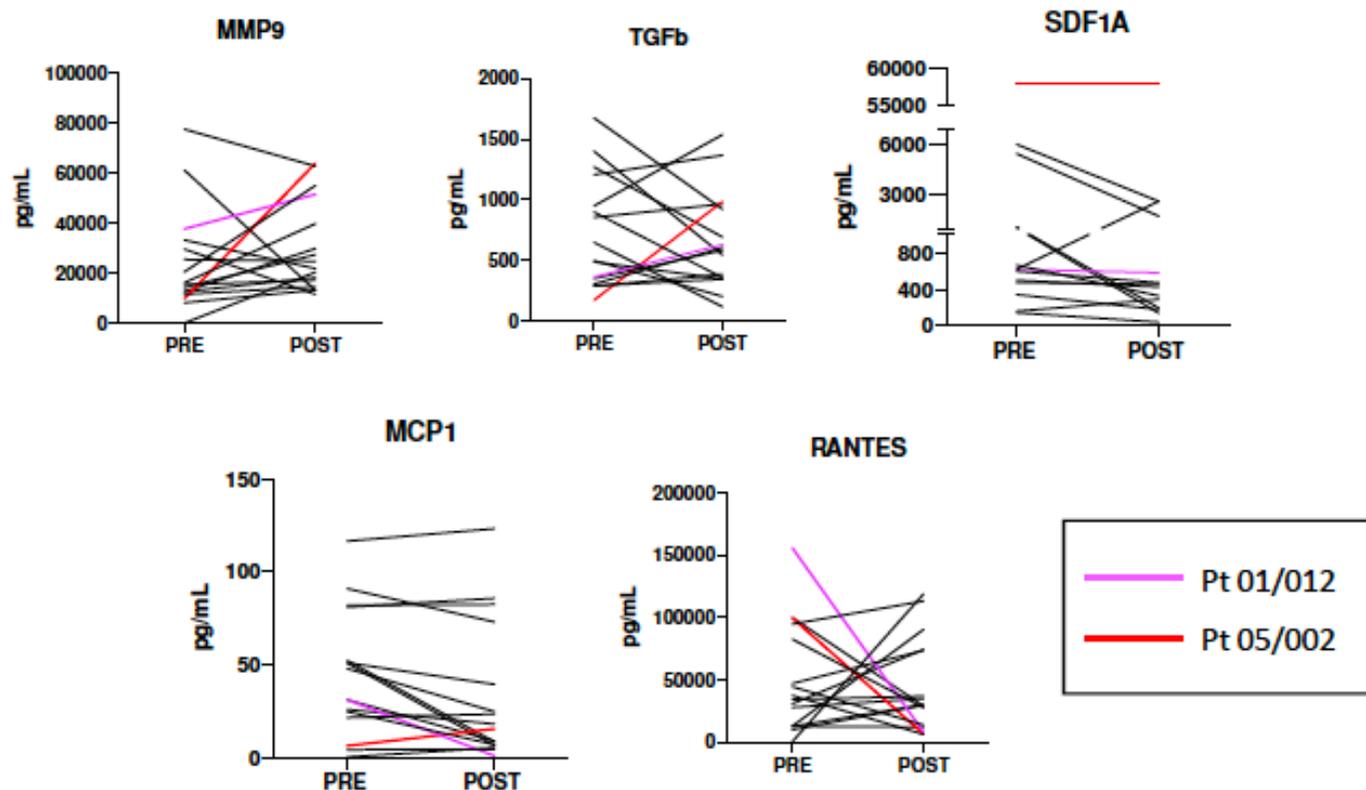
- Helena Oliveres
OLIVERES@clinic.cat
- Miquel Lozano
MLOZANO@clinic.cat
- Angels Ginés
MAGINES@clinic.cat
- Angeles García-Criado
MAGARCIA@clinic.cat
- Juan Ramon Ayuso
JRAYUSO@clinic.cat
- Mario Pagés
pages@clinic.cat
- Miriam Cuatrecasas
mquatrec@clinic.cat
- Ferràn Torres
ferran.torres@idibaps.org
- Timothy Thomson
titbmc@ibmb.csic.es
- Marta Cascante
martacascante@ub.edu
- ¹ Immunology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
- ² Medical Oncology Department, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain
- ³ Medical Oncology Department, Vall d'Hebrón Barcelona Hospital Campus, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁴ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁵ Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors Group, Medical Oncology Department, Hospital Clínic of Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona, C. Villarroel, 170. 08036 Barcelona, Spain
- ⁶ Medical Oncology Department, Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain
- ⁷ Medical Oncology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain
- ⁸ Apheresis & Cellular Therapy Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
- ⁹ Endoscopic Unit, Gastrointestinal Service, Hospital Clínic Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁰ Radiology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹¹ Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹² Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹³ Barcelona Institute for Molecular Biology, National Science Council (IBMB-CSIC), Barcelona, Spain
- ¹⁴ Networked Center for Hepatic and Digestive Diseases (CIBER-EHD), Instituto Nacional de La Salud Carlos III, Madrid, Spain
- ¹⁵ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

Supplementary information

Suppl Figure 1. Changes in concentrations of 5 of the cytokines analyzed comparing each patient baseline serum with that obtained at day 56 after treatment. Two patients with the mesenchymal subtype (cluster 1) were marked with purple and red colors.



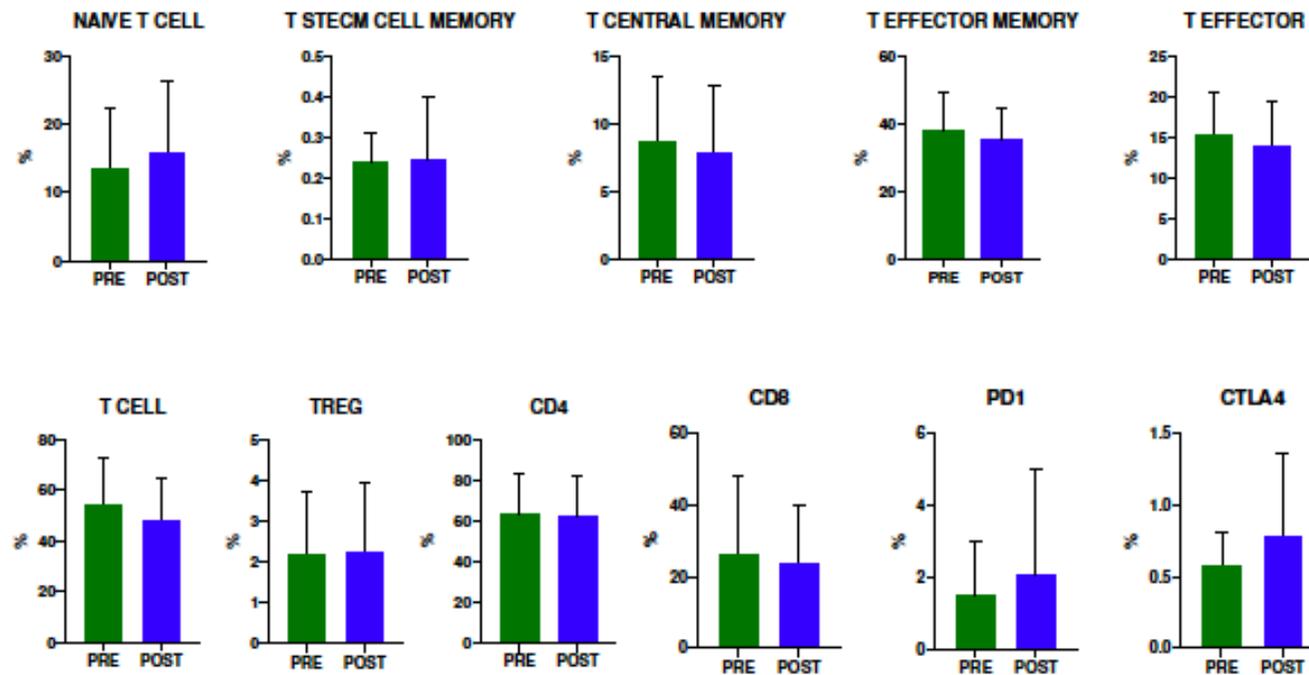
Suppl Figure 2. Changes in concentrations of 5 of the cytokines analyzed comparing each patient baseline serum with that obtained at day 56 after treatment. Two patients with the mesenchymal subtype (cluster 1) were marked with purple and red colors.



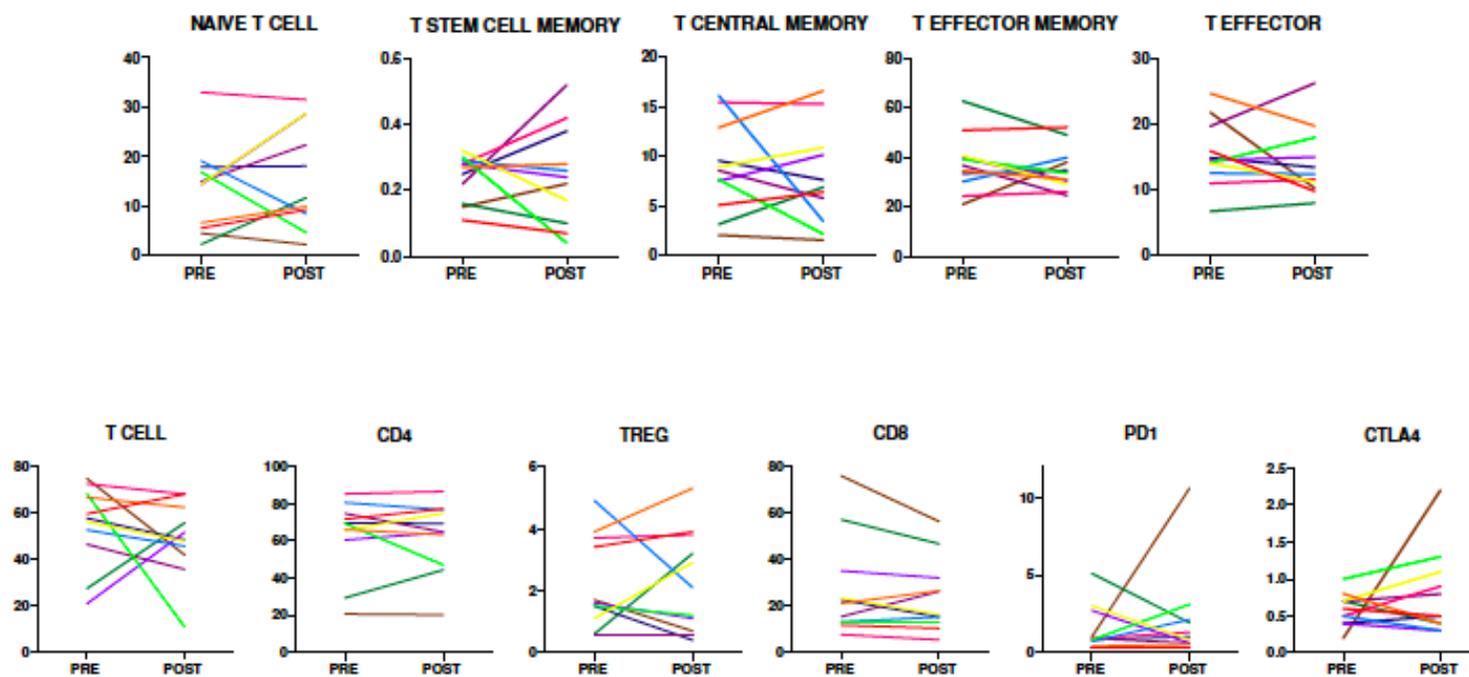
Suppl Figure 3. Changes in concentrations of 5 of the cytokines analyzed comparing each patient baseline serum with that obtained at day 56 after treatment. Two patients with the mesenchymal subtype (cluster 1) were marked with purple.

		SDF1a (CXCL12)		MCP1 (CCL2)		MMP-9		RANTES (CCL5)		TGFb	
		PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
cluster 1	01-012	621,13	583,76	31,02	0,80	37756,75	51578,07	155547,57	8139,61	362,00	629,21
	05-002	57900,00	57900,00	6,18	15,39	9768,36	64089,85	99484,76	6436,54	171,86	984,19
cluster 3	01-003	477,43	457,61	24,67	6,95	77600,52	62895,38	94456,90	113016,81	1674,77	923,15
	01-004	624,83	2628,41	21,48	23,41	29637,83	11530,17	46910,55	73501,78	895,84	355,28
	01-007	342,83	180,55	81,04	85,87	16135,28	39849,01	82618,73	27539,78	289,68	343,40
	01-009	598,56	473,17	91,07	73,02	14275,09	27451,65	34099,54	36765,83	304,21	606,33
	01-011	164,30	289,78	81,91	82,55	11574,29	14587,83	44419,39	13687,90	487,50	346,38
	02-003	141,98	45,12	31,10	8,87	12626,31	18201,42	12669,43	12079,40	853,76	963,95
	02-005	6047,88	2637,34	47,90	24,81	15345,96	17236,23	27721,40	34879,56	949,07	1535,72
	04-001	499,16	425,66	0,32	5,14	25542,03	24789,75	12749,64	90208,70	1205,46	1365,20
	05-001	5472,28	1736,62	25,84	17,94	61279,97	13154,55	9889,52	29333,39	349,69	580,46
	05-004	1080,71	198,87	50,86	6,44	12652,06	29846,44	12362,37	30135,08	496,48	201,20

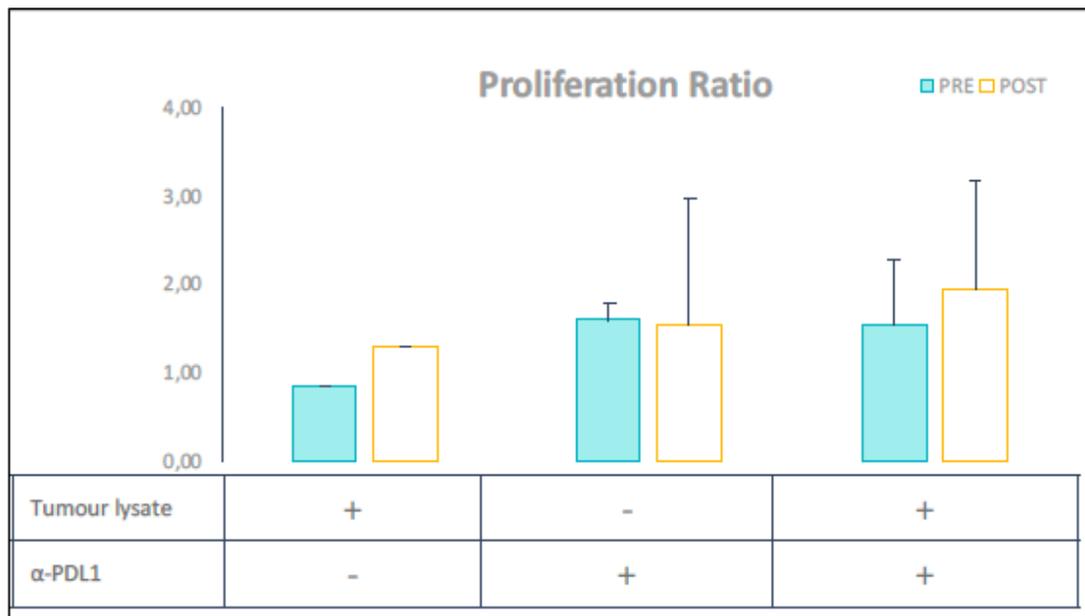
Suppl Figure 4. Lymphocyte subpopulations in the PBMCs of 11 patients obtained from peripheral blood before and 56 days after receiving the combination therapy.



Suppl Figure 5. Lymphocyte subpopulations in the PBMCs of 11 patients obtained from peripheral blood before and 56 days after receiving the combination therapy.



Suppl figure 6. Autologous tumour mixed leucocyte reaction at day 0 (PRE) and 56 (POST). Results were expressed as counts per minute (cpm). To normalize and analyze all patients together; a proliferation ratio (Cpm [condition] / Cpm [negative control: without tumour lysate and without avelumab]) was calculated. Proliferation was higher after treatment (POST) with the tumour lysate.



Suppl figure 7. Cytokine levels of inflammatory (IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines of ATMLR supernatants. Levels of IFN- γ were higher on the supernatants of patient's co-cultures after receiving therapy (POST) and no levels of IL-10 were detected (<10 pg/mL).

