

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Identificación y caracterización de linfocitos T  
neoantígeno específicos de donantes sanos con fines de  
inmunoterapia en cáncer**

**LAURA CAMILA MARTÍNEZ ENRÍQUEZ**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2022

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T  
NEOANTÍGENO ESPECÍFICOS DE DONANTES SANOS CON FINES  
DE INMUNOTERAPIA EN CÁNCER**

**Laura Camila Martínez Enríquez**

Tesis presentada como requisito para optar el título de:  
**Magister en Inmunología – Investigación.**

**Director:**

Carlos Alberto Parra López

PhD., Profesor Titular, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional de Colombia.

Grupo de Investigación:

**Inmunología y Medicina Traslacional.**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2022

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, novio, amigas y amigos por no dejarme sola tantas veces que quise estarlo, no hubiese logrado nada de esto si no fuese por todos ustedes.

A Noris y Dani por nunca dudar que lo lograría y apoyarme en esta aventura que fue la maestría. Por ser mi ejemplo de vida y darme todas las herramientas para lograr mis propósitos en la vida, ustedes siempre serán mi mayor inspiración. A mis hermanos Herny y Feli por estar tan pendientes de mí y comprender cada paso que daba.

A Esteban, por estar a mi lado incondicionalmente durante estos 3 años, por darme su hombro para llorar ante cada crisis, por no dejarme rendirme nunca, por tanta confianza y tanto amor. Gracias por todo lo que hemos vivido y por lo que viviremos.

A Manuela, Nicolas, Oscar, Villota, Ivón y Diego por hacerme sentir bienvenida al grupo desde el primer momento y enseñarme sobre la inmunología, el laboratorio, la vida, el feminismo, la buena música y en general a entender que la vida se vive mejor rodeado de amigos. Ustedes hicieron de esta maestría una enseñanza de vida en todos los aspectos, entre siendo una persona y salí siendo otra completamente renovada y llena de aprendizaje.

A mis amigas Camila, Mahecha, Luci y Nathaly porque a pesar de la distancia siempre estuvieron pendientes de mí y de cómo estaba todo, de escucharme quejarme y darme siempre una palabra de aliento.

A mi director de tesis, el profe Parra, por introducirme al mundo de la inmunología y enseñarme lo que sabe sobre esta. Por la confianza que siempre me tuvo para llevar a cabo esta tesis y otros proyectos importantes para el grupo de investigación. Estoy enormemente agradecida de haber pertenecido al grupo de inmunología y medicina traslacional ya que aquí me formé como científica y como persona.

Por último, a la universidad Nacional de Colombia y todas las personas que conocí allí, porque me sacaron de mi burbuja privada y me mostraron una perspectiva completamente diferente de la vida.

## Resumen

### IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T NEOANTÍGENO ESPECÍFICOS DE DONANTES SANOS CON FINES DE INMUNOTERAPIA EN CÁNCER

La inmunoterapia basada en neoantígenos permite estimular el sistema inmune del paciente con cáncer al inducir una respuesta antitumoral dirigida mediada por Linfocitos T (LT). Los neoantígenos son generados por mutaciones somáticas en el ADN que producen cambios en la secuencia de aminoácidos y que son exclusivas de las células tumorales. La selección de neoantígenos inmunogénicos se realiza por medio de herramientas *in-silico* que predicen la afinidad y tiempo de unión del neoantígeno a la molécula de HLA, luego estos son evaluados en sistemas de cultivo *in-vitro* con las células de los pacientes, sin embargo, la frecuencia reportada de respuestas a neoantígenos es aún baja. Por lo tanto, este estudio planteó dos acercamientos diferentes para identificar y caracterizar neoantígenos inmunogénicos. Por un lado, se propuso la implementación de sistemas de cultivo con células de donantes sanos para evaluar la inmunogenicidad de los neoantígenos de manera *in-vitro*. Por otra parte, se propuso el uso del docking y la dinámica molecular para identificar características moleculares asociadas a la inmunogenicidad de los neoantígenos.

Para el primer enfoque se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos HLA-A\*02:01. Se evaluaron cuatro tipos de cultivos diferentes, manteniendo el uso de las citoquinas IL-21, IL-15 e IL-7 pero modificando las células de partida: i) PBMCs totales, ii) cocultivo acelerado con células dendríticas a partir de PBMCs, iii) cocultivo de células dendríticas *in-situ* (DCs *in-situ*) con LT CD8+ vírgenes enriquecidos y iv) cocultivo de células dendríticas por adherencia de monocitos (moDCs) con LT CD8+ vírgenes enriquecidos. Los neoantígenos restringidos a HLA-A\*02:01 fueron seleccionados a partir de una búsqueda en la literatura y se evaluaron en forma de pool. El reconocimiento de los LT CD8+ a neoantígenos se evaluó mediante la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y por la marcación de tetrámeros. Como resultados se pudo observar que

es necesaria la presencia de células presentadoras profesionales, como lo son las DC, y un enriquecimiento de los LT CD8 vírgenes, pues fue en este cultivo que se logró detectar, aunque en baja proporción, LT específicos contra los neoantígenos. No obstante, estos resultados solo se observaron en 2 de 4 donantes evaluados, lo cual indica que es necesario realizar ensayos adicionales para poder determinar que este sistema de cultivo es el indicado. Para el segundo enfoque se realizó una prueba de concepto con dos neoantígenos (uno inmunogénico y otro no inmunogénico) para evaluar el uso del docking y la dinámica molecular como herramientas de tamizaje para la identificación de neoantígenos inmunogénicos, permitiendo determinar que un neoantígeno inmunogénico debe formar un complejo péptido-MHC estable en el tiempo.

Este estudio demuestra la alta complejidad que representa el uso de células de donantes sanos y de las herramientas computacionales de docking y dinámica molecular, sin embargo, estos dos enfoques son prometedores ya que no solo permitirían mejorar la selección de neoantígenos inmunogénicos sino también tienen el potencial de identificar TCR específicos contra estos antígenos con fines de terapia adoptiva celular basada en modificación del TCR.

**Palabras clave:** Neoantígenos, inmunogenicidad, donantes sanos, Linfocitos T CD8, tetrámero.

## Abstract

### IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIGEN SPECIFIC T CELLS FROM HEALTHY DONORS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Immunotherapy based on neoantigens allows to stimulate the immune system of cancer patients by inducing a directed antitumor response mediated by T cells. Neoantigens are generated by somatic mutations in DNA that produce changes in the amino acid sequence and are exclusive to tumor cells. The selection of immunogenic neoantigens to predict the affinity and binding of the neoantigen to the HLA is performed *in silico* and then evaluated with *in vitro* culture assays with patient cells, however, the reported frequency of responses to neoantigens is low. Therefore, this study proposed two different approaches to identify and characterize immunogenic neoantigens. On the one hand, the implementation of culture systems with cells from healthy donors to evaluate the immunogenicity of neoantigens *in vitro*. On the other hand, the use of docking and molecular dynamics to identify *in silico* molecular characteristics associated with the immunogenicity of neoantigens.

To evaluate the first approach, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy HLA-A\*02:01 donors were used as a model. HLA-A\*02:01-restricted neoantigens were selected from a literature search and evaluated as a pool. Four different types of cultures were evaluated, maintaining the use of the cytokines IL-21, IL-15 and IL-7 but modifying the starting cells: i) total PBMCs, ii) accelerated co-culture with dendritic cells (acDCs) from PBMCs and iii) co-culture of dendritic cells *in situ* with Naïve CD8<sup>+</sup> T cells and iv) co-culture of monocyte derived dendritic cells with Naïve CD8<sup>+</sup> T cells. Recognition of CD8<sup>+</sup> T cells to neoantigens was assessed by cytokine production and by tetramer labeling. It was possible to observe that the presence of professional antigen presenting cells, such as DCs, and an enrichment of Naïve CD8<sup>+</sup> T cells is necessary to detect, although in low proportion, specific LTs against neoantigens. However, these results were only observed in 2 of

4 donors evaluated, which indicates that additional tests are necessary to determine if this culture system work. For the second approach, a proof of concept was carried out with two neoantigens (one immunogenic and one non-immunogenic) to evaluate the use of docking and molecular dynamics as screening tools for the identification of immunogenic neoantigens, allowing to determine that an immunogenic neoantigen should form a peptide-MHC complex stable over time.

This study demonstrates the high complexity of using healthy donor cells and tools such as molecular dynamics and docking, however, these two approaches are promising since they would not only allow to improve the selection of immunogenic neoantigens but also the identification of TCRs specific to neoantigens for adoptive cell therapy with cell modification of the TCR.

**Keywords:** Neoantigens, immunogenicity, healthy donors, CD8 T cells, tetramer.

## Tabla de contenido

<b>Agradecimientos</b>	3
<b>Resumen</b>	4
<b>Abstract</b>	6
<b>Tabla de contenido</b>	8
<b>Índice de figuras</b>	10
<b>Índice de figuras suplementarias</b>	14
<b>Índice de anexos</b>	16
<b>Lista de abreviaturas</b>	17
<b>1. Introducción</b>	18
<b>2. Problema de investigación y Justificación</b>	19
<b>3. Preguntas de investigación</b>	22
<b>4. Objetivos</b>	23
<b>4.1 Objetivo general</b>	23
<b>4.2 Objetivos específicos</b>	23
<b>5. Marco teórico</b>	24
<b>5.1 Inmunoterapia basada en neoantígenos</b>	24
<b>5.1.1 Definición de neoantígeno</b>	24
<b>5.1.2 Tipos de Neoantígenos</b>	24
<b>5.1.3. Predicción de neoantígenos</b>	27
<b>5.1.3.1 Identificación de mutaciones no sinónimas del tumor</b>	27
<b>5.1.3.2. Selección de candidatos a neoantígenos</b>	28
<b>5.1.4. Evaluación de inmunogenicidad <i>in-vitro</i></b>	29
<b>5.3. Métodos computacionales para el estudio de interacciones péptido-proteína</b>	33
<b>5.3.1 Simulaciones de la interacciones péptido-proteina por docking molecular y dinámica molecular</b>	34
<b>5.3.2 Herramientas computacionales para estudiar la especificidad de unión de péptidos a moléculas MHC.</b>	35
<b>6. Materiales y métodos</b>	37



<b>6.1 Resumen ejecutivo de la metodología</b>	37
<b>6.2 Metodología detallada y actividades para alcanzar cada objetivo específico</b>	42
<b>6.2.1 Objetivo específico 1: Implementar un sistema de cultivo que permita evidenciar el reconocimiento de diferentes tipos de neoantígenos tumorales por Linfocitos T CD8+ de donantes sanos.</b>	42
<b>6.2.2 Objetivo específico 2: Caracterizar el fenotipo de memoria y la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia de los Linfocitos T específicos contra estos neoantígenos.</b>	52
<b>6.2.3 Objetivo específico 3: Analizar los aspectos moleculares y estructurales de las interacciones entre neoantígenos y MHC (Complejo péptido-HLA).</b>	53
<b>6.3 Colección y análisis de datos</b>	55
<b>7. Resultados</b>	55
<b>7.1 Primer objetivo</b>	55
<b>7.1.1 Características de los neoantígenos seleccionados</b>	55
<b>7.1.2 Primer sistema de cultivo: PBMCs totales permiten identificar la respuesta solo a péptidos modelo.</b>	59
<b>7.1.3 Segundo sistema de cultivo: El cocultivo acelerado de células dendríticas (acDCs) genera una mayor respuesta al pool de A2 y pools de neoantígenos.</b>	63
<b>7.1.4 Tercer sistema de cultivo: El cocultivo de DCs <i>in-situ</i> con LT CD8 vírgenes</b>	68
<b>7.1.5 Cuarto sistema de cultivo: Cocultivo de moDCs con LT CD8 vírgenes permite la detección de LT neoantígeno específicos.</b>	72
<b>7.1.6 Comparación entre los diferentes sistemas de cultivo</b>	78
<b>7.2 Segundo objetivo</b>	80
<b>7.2.1 Las células neoantígeno específicas mantienen el fenotipo virgen y una baja co-expresión de marcadores de agotamiento.</b>	80
<b>7.3. Tercer objetivo</b>	88
<b>7.3.2 Simulaciones moleculares</b>	90
<b>7.3.4 Interacciones atómicas</b>	93
<b>7.3.5 Intensidad de las interacciones</b>	95
<b>7.3.6 Interacciones atómicas de P1 con el HLA en ASTN1</b>	96
<b>7.3.7 Interacciones atómicas entre P2 y sus vecinos en ASTN1</b>	97
<b>8. Discusión</b>	99
<b>9. Perspectivas</b>	113
<b>10. Consideraciones éticas</b>	115
<b>11. Apropiación social del conocimiento</b>	116

<b>12. Referencias</b>	117
<b>13. Figuras suplementarias</b>	127
<b>14. Tablas suplementarias</b>	136

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema del proceso de predicción e identificación de neoantígenos	19
Figura 2. Generación y reconocimiento de los neoantígenos por mutaciones SNV o FS	25
Figura 3. Lista del top 10 de neoantígenos públicos según el número de pacientes con cáncer por año en Estados Unidos	27
Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de selección de los neoantígenos	37
Figura 5. Diagrama de flujo del primer sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos	38
Figura 6. Diagrama de flujo del segundo sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos	39
Figura 7. Diagrama de flujo del tercer sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos.	40
Figura 8. Diagrama de flujo del cuarto sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos.	41
Figura 9. Diagrama de flujo para la modelación y simulación por docking y dinámica molecular	42
Figura 11. Ensayo de medición de afinidad de unión relativa de los neoantígenos seleccionados a la molécula A2 utilizando células T2.	59
Figura 12. Secreción de IFN- $\gamma$ por PBMCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.	61
Figura 13. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 a partir de PBMC totales estimuladas con el pool de péptidos en medio suplementado con IL-21, IL-7 e IL-15	63
Figura 14. Secreción de IFN- $\gamma$ en cultivo acDCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.	65
Figura 15. Ensayo de ELISPOT de IFN- $\gamma$ en las células del cultivo de acDCs para los donantes 2 y 12.	66
Figura 16. Producción de citoquinas intracelulares después de una o dos rondas de estimulación con los pools de antígeno.	67
Figura 17. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool Neo 2 a partir de cultivo acDCs.	67

Figura 18. Producción de citoquinas intracelulares después dos rondas de estimulación con los pooles de antígeno para dos donantes diferentes	68
Figura 19. Obtención de DCs <i>in-situ</i> y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales.	70
Figura 20. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con DCs in-situ después de una y dos rondas de estimulación con los pooles de antígenos.	71
Figura 21. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 en el donante 2	72
Figura 22. Obtención de DCs derivados de monocitos y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales en los donantes 1 y 12.	74
Figura 23. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con moDCs después de una y dos rondas de estimulación con el pool de A2.	75
Figura 24. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con moDCs después de una y dos rondas de estimulación con el pool de neoantígenos	76
Figura 25. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 en el donante 2.	77
Figura 26 . Detección de LT CD8+ específicos a los neoantígeno del pool Neo 2 y Neo 3 en los donantes 1 y 12.	78
Figura 27. Comparación en el <i>fold change</i> del % LT CD8 productoras de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ intracelular según el sistema de cultivo.	79
Figura 28. Comparación del % LT CD8 tetrámero específicos para los péptidos del pool de A2 y el pool Neo 2 según el sistema de cultivo	79
Figura 29. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 2 mediante el tercer sistema de cultivo.	81
Figura 30. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.	83
Figura 31. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 1 mediante el cuarto sistema de cultivo	85
Figura 32. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.	87

Figura 33. Comparación del fenotipo de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 vs el pool de neoantígenos en el donante 12 obtenidos mediante el cuarto sistema de cultivo	87
Figura 34. Comparación en la expresión total de marcadores de agotamiento y senescencia de los linfocitos estimulados con el pool A2 vs el pool de neoantígenos en el donante 12 obtenidos mediante el cuarto sistema de cultivo	88
Figura 35. Conformación de péptidos silvestres y mutantes para AKPK6 y ASTN1 unidos a HLA-A*02:01.	91
Figura 36. Cantidad y tipo de interacciones entre cada uno de los aminoácidos de los antígenos y el HLA-A*02:01.	94
Figura 37. Intensidad de las interacciones entre cada uno de los aminoácidos de los antígenos con HLA-A*02:01.	95
Figura 38. Visualización de las 4 interacciones diferencialmente presentes en el antígeno de ASTN1 respecto a su contraparte silvestre.	97

## Índice de tablas

Tabla 1: Secuencias de los péptidos seleccionados para el presente estudio	54
Tabla 2. Descripción general de los neoantígenos seleccionados.	56
Tabla 3. Comparación de la cuantificación de los resultados del ELISPOT según el tipo de cultivo	78
Tabla 4. Evaluación de las diferentes herramientas tradicionalmente utilizadas para la identificación de neoantígenos	90
Tabla 5: Top 10 interacciones atómicas entre los péptidos silvestre y mutante del neoantígenos ASTN1 y HLA-A*02:01.	96

## Índice de figuras suplementarias

Figura S1. Estrategia de “gating” para la identificación de LT CD8 antígeno específico mediante la marcación doble de tetrámero	127
Figura S2. Expansión in vitro de LT CD8+ específicos a la epítope CMV mediante el primer sistema de cultivo.	127
Figura S3. Concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-2 secretadas en el cultivo de acDCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos	128
Figura S4. Estrategia de análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo para la detección de LT CD8+ secretores de IFN- $\gamma$ y/o TNF- $\alpha$ ante reestímulo con pools de péptidos.	129
Figura S5. Viabilidad de las células del donante 2 después de dos ronda de estimulación con el pool A2 vs el pool Neo 2	129
Figura S6. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool Neo 1 y Neo 3 a partir de cultivo acDCs.	129
Figura S7. Obtención de DCs in-situ y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales.	130
Figura S8. Estrategia de “gating” de enriquecimiento de la fracción vírgen de LT CD8	130
Figura S9. Viabilidad de las células del donante 4 después de dos ronda de estimulación con el pool A2 vs el pool Neo 1	131
Figura S10. Comparación de las concentración de las citoquinas TNF- $\alpha$ e IL-2 secretadas durante la evaluación de respuesta en el ELISPOT de las células provenientes del sistema de cultivo 3 y 4.	131
Figura S11. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 2 mediante el tercer sistema de cultivo	132
Figura S12. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.	133
Figura S13. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 1 mediante el cuarto sistema de cultivo	134
Figura S14. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.	135

## Índice de tablas suplementarias

Tabla S1. Índices de fluorescencia para las tres concentraciones de los 23 péptidos evaluados por el ensayo de afinidad por T2.	136
Tabla S2. Descripción general de las unidades de sangre de donantes sanos HLA-A*02:01.	137
Tabla S3. Concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-2 secretadas por PBMCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos	137
Tabla S4. Comparación de la frecuencia (%) de LT CD8 productores de las citoquinas intracelulares IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ según el sistema de cultivo.	138
Tabla S5: Interacciones entre P1 y P2 en la versión WT de ASTN1	139
Tabla S6: Interacciones entre P1 y P2 en el neoantígeno ASTN1	140
Tabla S7: Interacciones entre P2 y P3 en la versión WT de ASTN1	142
Tabla S8: Interacciones entre P2 y P3 en el neoantígeno de ASTN1	143

## Índice de anexos

- Anexo I.....Tabla de características de los neoantígenos seleccionados.
- Anexo II.....Video simulación molecular de AKPK6 WT.
- Anexo III..... Video simulación molecular de AKPK6 Neo.
- Anexo IV.....Video simulación molecular de ASTN1 WT.
- Anexo V..... Video simulación molecular de ASTN1 Neo.
- Anexo VI..... Presentación resultados en el Simposio de Investigación en Cáncer, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana.
- Anexo VII..... Certificado de presentación en formato poster en el XIII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (ACAAI) y el V Encuentro de la Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI).
- Anexo VIII..... Infografía Importancia de preservar los tumores en el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer.
- Anexo IX.....Infografía interactiva sobre inmunoterapia.
- Anexo X.....Folleto Inmunoterapia contra el cáncer para paciente.
- Anexo XI.....Folleto Inmunoterapia en el tratamiento del cáncer: información básica para personal de salud.



## Lista de abreviaturas

ACT	Adoptive cell therapy – Terapia adoptiva de células
acDCs	Accelerated cocultured DCs - Cocultivo acelerado de células dendríticas
APC	Antigen Presenting Cells – Células presentadoras de antígeno
CBA	Cytometric Bead Array
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester - éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DCs	Dendritic cells - Células dendríticas
FS	Frameshift mutation – Mutación de cambio de marco abierto de lectura
HLA	Human leukocyte antigen - Antígeno leucocitario humano
ICS	Intracellular cytokine staining – Tinción de citoquinas intracelulares
IF	Índice de fluorescencia
IL	Interleuquina
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
LT	Linfocito T
LTscm	Linfocito T “stem cell-like” de memoria
MHC	Major Histocompatibility Complex – Complejo mayor de histocompatibilidad
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells – Células mononucleares de sangre periférica
PD-1	Programmed cell death protein 1
pMHC	Peptide-MHC complex – Complejo péptido-MHC
IR	Receptor inhibitorio
SNV	Single Nucleotide Variant- Variante de un solo nucleótido
TAA	Tumor Associated Antigen – Antígeno asociado a tumor
TSA	Tumor Specific Antigen – Antígeno específico de tumor
Tem	Linfocitos T efectores de memoria
TemRA	Linfocitos T terminalmente diferenciados
Tcm	Linfocitos T centrales de memoria
TCR	T Cell Receptor – Receptor de células T
TILs	Tumor Infiltrating Lymphocytes - Linfocitos T infiltrantes de tumor
WT	Wild Type – Versión silvestre

## 1. Introducción

El cáncer surge como resultado de la acumulación de daños en el ADN y alteraciones genéticas y epigenéticas que alteran el ciclo celular, suprimen el sistema inmune y promueven el escape de la respuesta antitumoral al ser células pobremente inmunogénicas [1, 2]. Esta enfermedad tiene una alta incidencia y mortalidad a nivel global. De acuerdo con un estudio realizado por GLOBOCAN, se estima que en el 2020 ocurrieron aproximadamente 19 millones de casos nuevos y 9.9 millones de muertes relacionadas con cáncer [3]. El tratamiento convencional se basa en tres pilares: cirugía, quimioterapia y radioterapia; sin embargo, en algunos casos no tienen el alcance terapéutico suficiente para controlar el tumor ni la especificidad necesaria para evitar el daño sobre células sanas. Por estas razones, la búsqueda en los últimos años de eliminar efectivamente los tumores y disminuir los efectos negativos de este proceso ha instaurado a la inmunoterapia como el cuarto pilar del tratamiento del cáncer [4-6].

La inmunoterapia del cáncer se fundamenta en el estudio de la inmunobiología de la enfermedad para así usar el sistema inmune para atacar a los tumores. Fundamentado en estas características han surgido inmunoterapias basadas en neoantígenos como lo son las vacunas personalizadas contra el cáncer y la terapia adoptiva de células neoantígeno-específicas (ACT) [4, 5], las cuales han demostrado generar reducción de tumores agresivos, tal como melanoma metastásico, glioblastoma y cáncer de pulmón de célula no pequeña [6-12]. Estas representan una estrategia novedosa y eficiente para generar una respuesta antitumoral dirigida, ya que los neoantígenos se originan a partir de mutaciones somáticas en el ADN, causando cambios en la secuencia de aminoácidos y que son exclusivas de las células tumorales, lo que los hace potencialmente inmunogénicos al no haber experimentado tolerancia en el timo [13, 14].

## 2. Problema de investigación y Justificación

Actualmente, las metodologías *in silico* para predecir candidatos a neoantígenos requieren la comparación de la secuencia de ADN del tumor con la secuencia obtenida de tejido sano del mismo paciente para poder identificar alteraciones somáticas en el ADN del tumor. Los neoantígenos predichos pueden ser tamizados mediante el uso de algoritmos computacionales basados en redes neuronales para estimar la probabilidad de ser procesados por el proteasoma y presentados en las moléculas antígeno leucocitario humano (HLA) del paciente [15]. Una vez se tiene una lista de neoantígenos es importante evaluar la inmunogenicidad de estos para identificar aquellos que sean útiles para la intervención clínica (Figura 1).

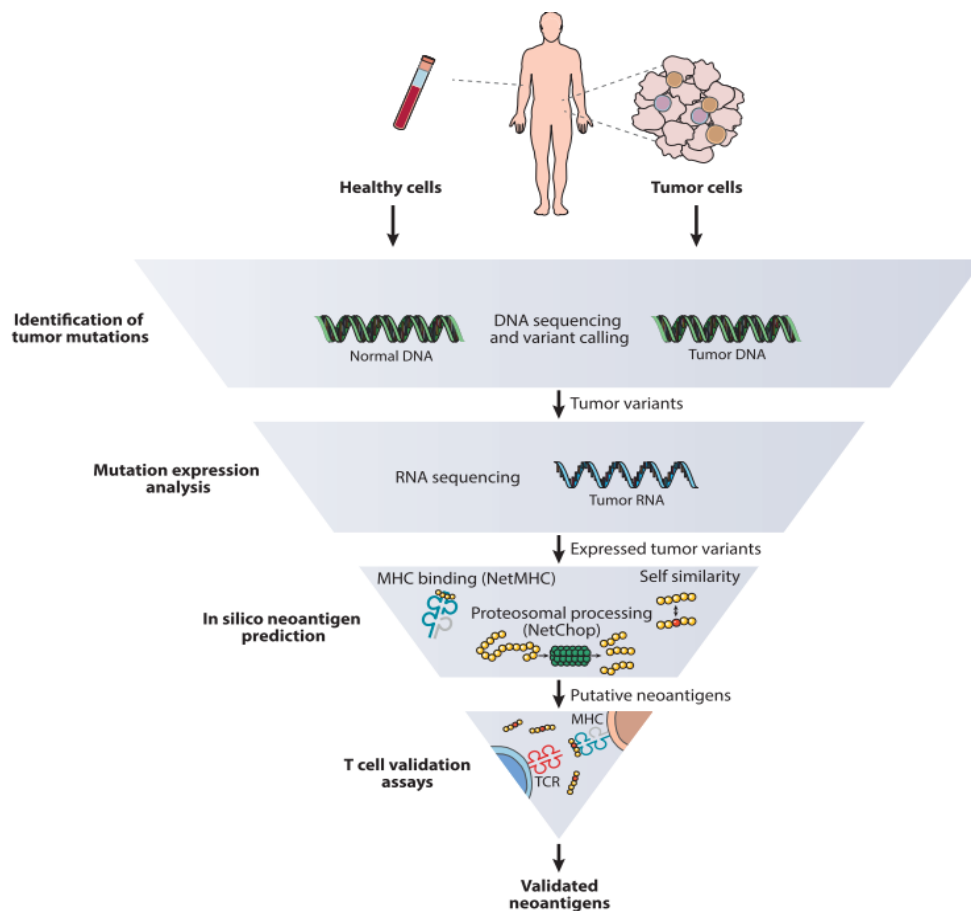


Figura 1. Esquema del proceso de predicción e identificación de neoantígenos [16]

La evaluación de la inmunogenicidad generalmente se realiza mediante sistemas *in vitro* con células de los mismos pacientes. La fuente de Linfocitos T (LT) puede

variar dependiendo del diseño experimental y dentro de estas están: Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) o las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Según una revisión realizada por Karpanen *et al.* en 2017 de diferentes estudios con neoantígenos, se pudo concluir que los ensayos que usan estas poblaciones celulares han mostrado que la frecuencia de respuestas con neoantígenos es baja, ya que solo un 1.2% de los péptidos con potencial inmunogénico pueden ser espontáneamente reconocidas en los pacientes [17]. Adicionalmente, el consorcio TESLA (Tumor Neoantigen Selection Alliance) en 2020 reportó que la cantidad de péptidos inmunogénicos detectados por tetrámero son bajos, pues tan solo el 6% de los neoantígenos evaluados tenían precursores (37/608) [18]. Se han propuesto tres posibles razones para la respuesta insuficiente de los LT: (i) Los procesos de predicción, identificación y/o selección de los neoantígenos no tienen la suficiente sensibilidad y especificidad. (ii) Los neoantígenos predichos a pesar de ser extraños para el SI, pueden ser tolerados o simplemente no ser reconocidos por tener un repertorio que no cubra esa secuencia de aminoácidos [19]. (iii) Los ensayos se están haciendo en pacientes que por tener cáncer tienen un SI alterado, por lo tanto, la presentación del neoantígeno por las células presentadoras profesionales (APC) puede ser insuficiente o los LT neoantígeno específicos pueden tener un fenotipo agotado o senescente que comprometa la respuesta antitumoral [20].

Por lo tanto, se hace necesario explorar un nuevo enfoque que permitan mejorar la selección de neoantígenos inmunogénicos. Por un lado, han surgido herramientas computacionales como el docking y la dinámica molecular, que permiten develar los mecanismos de interacción entre moléculas a nivel atómico, siendo útiles para el diseño racional de fármacos y comprensión de interacciones no covalentes de tipo receptor-ligando [21]. Por lo tanto estas herramientas pueden ser utilizadas para analizar las interacciones HLA-péptido-TCR con el fin de generar información adicional que permita identificar con mayor precisión neoantígenos que sean presentados por el MHC y reconocidos por el TCR, características que otorgan inmunogenicidad.

Por un lado, Strønen *et al.* propusieron un sistema de evaluación de inmunogenicidad alternativo con células de donantes sanos logrando detectar el reconocimiento de neoantígenos en los LT de los donantes que los TILs del paciente no reconocieron [22]. Este acercamiento es prometedor ya que el tener un repertorio de receptores de LT (TCR) proveniente de un individuo sano provee un sistema de tamizaje para determinar cuáles neoantígenos son inmunogénicos independiente del estado del sistema inmune del paciente. Sin embargo, la metodología presentada en ese estudio era compleja, costosa y laboriosa.

### 3. Preguntas de investigación

Con base en estos aspectos, en este trabajo se plantearon dos preguntas de investigación en aras de poder identificar y caracterizar neoantígenos inmunogénicos.

- 1) ¿Es posible implementar un sistema de cultivo que permita la detección de LT neoantígeno específicos a partir de células de donantes sanos?
- 2) ¿El uso del docking y la dinámica molecular sirven como herramienta *in-silico* para identificar características moleculares asociadas a la inmunogenicidad de los neoantígenos?

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Implementar un sistema de cultivo que permita la detección y expansión *in vitro* de Linfocitos T específicos para neoantígenos tumorales a partir de PBMCs de donantes sanos.

### 4.2 Objetivos específicos

- Implementar un sistema de cultivo que permita evidenciar el reconocimiento de diferentes tipos de neoantígenos tumorales por Linfocitos T CD8+ de donantes sanos.
- Caracterizar el fenotipo de memoria y la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia de los Linfocitos T específicos contra estos neoantígenos.
- Analizar los aspectos moleculares y estructurales de las interacciones entre neoantígenos y MHC (Complejo péptido-MHC).

## 5. Marco teórico

### 5.1 Inmunoterapia basada en neoantígenos

La inmunoterapia basada en neoantígenos tiene como objetivo generar o aumentar la respuesta antitumoral dirigida. Este tipo de inmunoterapia incluye dos estrategias: Por un lado, las vacunas personalizadas contra el cáncer se basan en la presentación de los neoantígenos junto con señales de activación ya sea mediante péptidos sintéticos largos, DCs pulsadas con los antígenos, mRNA o DNA, con el fin de lograr la estimulación de LT antitumorales en los pacientes [5]. Por el otro lado, la terapia adoptiva de células parte de la detección y expansión de LT neoantígeno específicos, ya sean con TCR autólogos o insertados por modificación génica, para la posterior reinfusión de estos en el paciente [13, 23, 24].

#### 5.1.1 Definición de neoantígeno

Los neoantígenos son péptidos o proteínas propios del tumor que se generan por mutaciones somáticas no sinónimas en el genoma de las células cancerígenas. Esta característica les confiere un potencial inmunogénico alto ya que la secuencia peptídica mutada es diferente a la original y por lo tanto son reconocidos como algo exógeno por el sistema inmune [14, 25]. Estas variantes son blancos terapéuticos ideales ya que tienen un gran potencial de maximizar la especificidad de la respuesta, superar la tolerancia inmune y por lo tanto generar un efecto terapéutico dirigido duradero [26].

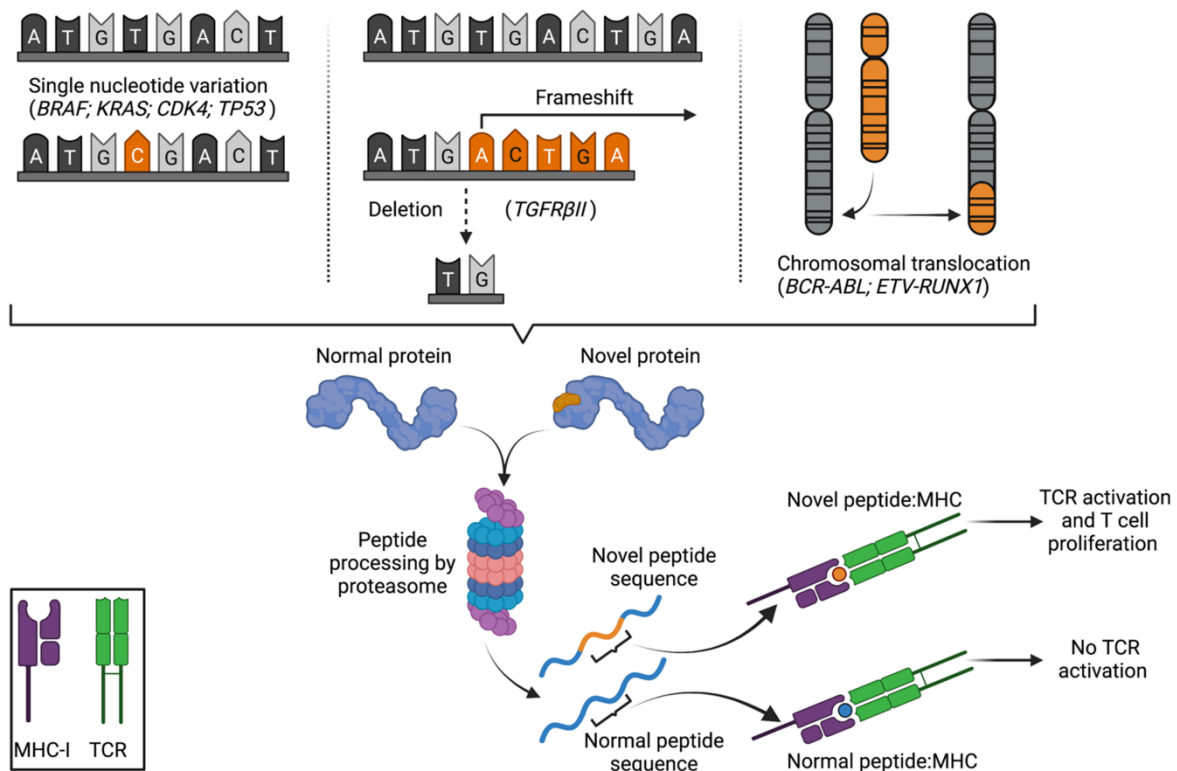
#### 5.1.2 Tipos de Neoantígenos

Las principales características para clasificar a los neoantígenos son: (i) El tipo de mutación que generó el neoantígeno (ii) El espectro de cubrimiento en la población. Sin embargo, estas propiedades no son excluyentes entre sí.

Los neoantígenos pueden ser originados por mutaciones de un solo nucleótido causando el cambio de un solo aminoácido (SNV) o por mutaciones que cambian el marco abierto de lectura, como inserciones/delecciones, retención de intrones o traslocaciones, generando secuencias de aminoácidos completamente nuevas (FS) [27, 28]. Aquellos neoantígenos que provienen de SNVs son los más comunes,



estudiados y usados como fuente de neoantígenos, ya que son más fáciles de caracterizar que los FS [29]. En el 2017 Turajlic *et al.* realizaron un análisis pan-cáncer de los neoantígenos provenientes de SNVs vs FS, donde obtuvieron que la mayoría de las publicaciones se enfocaban en neoantígenos generados por SNVs, concluyendo que el efecto de los FS en la inmunidad antitumoral no había logrado ser caracterizada completamente hasta ese entonces [30]. No obstante, en los últimos años se ha visto un aumento en los estudios de FS que demuestran que estos son también blancos terapéuticos valiosos por su potencial de generar péptidos altamente inmunogénicos y provocar una potente respuesta inmune debido a la gran divergencia que hay de la secuencia silvestre [29-35].



**Figura 2. Generación y reconocimiento de los neoantígenos por mutaciones SNV o FS.** Una vez los neoantígenos son generados estos son procesados y presentados en el contexto de MHC e inducen la activación de TCRs. Tomada de Verdon *et al.* [36].

A través de los años se ha podido observar que no todas las mutaciones somáticas ocurren al azar, de hecho, algunos genes suelen estar más mutados que otros,

estos genes y posiciones con alta frecuencia de mutaciones se les denomina *hotspots* genéticos. Así mismo, estos *hotspots* genéticos suelen ocurrir en genes que promueven la oncogénesis llamados genes *driver*, los cuales aparecen frecuentemente en etapas tempranas de la transformación celular y por lo tanto sólo un número limitado de aminoácidos puede ser sustituido, sin embargo, estas mutaciones son fundamentales para mantener el fenotipo maligno [37]. Por lo anterior, los neoantígenos generados por mutaciones en los genes *driver* son priorizados como blanco en la inmunoterapia contra el cáncer [38, 39]. Adicionalmente, debido a la heterogeneidad de las mutaciones en las células tumorales, tener como blanco mutaciones en genes que parecen estar expresadas homogéneamente en cáncer representa una estrategia para eliminar a las células tumorales más eficientemente [40]. Por ejemplo, ya existen ensayos clínicos que tienen como blanco el *hotspot* genético del codón 12 (G12D, G12V, G12A) del proto-oncogén KRAS, el cual está compartido en alta frecuencia a lo largo de múltiples tipos de cáncer, por ejemplo, en cáncer de páncreas la mutación G12A está presente en 10-90% de los pacientes [7, 41, 42].

Históricamente, la identificación de neoantígenos es realizada para cada paciente haciendo que estos sean específicos para cada individuo o “privados”. Estos están caracterizados por resultar de mutaciones pasajeras aleatorias y tener un mayor potencial de heterogeneidad clonal y presión de selección, mecanismos que se han asociado a resistencia a la inmunoterapia [43, 44]. No obstante, en los últimos años se ha introducido el término neoantígeno compartido o “público”, el cual hace referencia a neoantígenos que aparecen sistemáticamente a lo largo de una cohorte de pacientes y se unen a un alelo HLA en común, provienen principalmente de mutaciones *driver* y por ende se caracterizan por tener una heterogeneidad clonal y presión de selección baja, pues son mutaciones esenciales para el mantenimiento del cáncer [45-47].

La frecuencia de mutaciones *driver* permite dar indicios que tener como blanco el uso de neoantígenos públicos puede potencialmente beneficiar a una gran población de pacientes, pues permitiría crear bancos de neoantígenos o TCR

específicos para los neoantígenos que podrían ser rápidamente identificados en pacientes con cáncer para uso terapéutico [48]. Esto se puede ver ejemplificado en figura 3, donde se muestra el top 10 de mutaciones, su respectivo alelo, la frecuencia que hay tanto de la mutación como del neoantígeno y la incidencia de tumores con dicho neoantígeno [47].

Gene	Protein alteration	HLA	Top cancer	HLA frequency <sup>a</sup> (%)	Mutation frequency <sup>b</sup> (%)		Neoantigen frequency <sup>c</sup> (%)		Incidence of cancers carrying neoantigen <sup>d</sup>	
					All cancers <sup>e</sup>	Top cancer <sup>f</sup>	All cancers <sup>e</sup>	Top cancer <sup>f</sup>	All cancers <sup>e</sup>	Top cancer <sup>f</sup>
<i>BRAF</i>	p.Val600Glu	A*02	Melanoma	41.9	7.1	43.9	3.0	18.4	40,000	18,000
<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	A*03	Pancreas	21.7	3.8	32.4	0.8	7.0	11,000	4,000
<i>KRAS</i>	p.Gly12Val	A*03:01	Lung	21.7	3.3	6.7	0.7	1.5	10,000	3,000
<i>TP53</i>	p.Arg175His	A*02:01	Colorectum	41.9	1.6	6.5	0.7	2.7	9,000	4,000
<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	A*11:01	Pancreas	10.8	3.8	32.4	0.4	3.5	6,000	2,000
<i>KRAS</i>	p.Gly12Val	B*35	Lung	11.4	3.3	6.7	0.4	0.8	5,000	1,700
<i>HRAS/KRAS/NRAS<sup>g</sup></i>	p.Gln61Arg	A*01:01	Melanoma	23.6	1.6	12.4	0.4	2.9	5,000	2,900
<i>KRAS</i>	p.Gly12Val	A*11:01	Lung	10.8	3.3	6.7	0.4	0.7	5,000	1,700
<i>BRAF</i>	p.Val600Glu	B*27:05	Melanoma	4.8	7.1	43.9	0.3	2.1	5,000	2,100
<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	C*08:02	Pancreas	7.5	3.8	32.4	0.3	2.4	4,000	1,400

Figura 3. Lista del top 10 de neoantígenos públicos según el número de pacientes con cáncer por año en Estados Unidos. Tomado de Pearlman *et al.* [47]

### 5.1.3. Predicción de neoantígenos

#### 5.1.3.1 Identificación de mutaciones no sinónimas del tumor

La identificación y predicción de neoantígenos es llevada a cabo mediante un sistema *in-silico* que parte de la comparación entre la secuenciación del exoma de tejido sano y tumoral, con el fin de generar un listado de variantes genéticas para posteriormente identificar si estas son mutaciones no sinónimas exclusivas del tumor, las cuales corresponden a los neoantígenos. Adicionalmente, se realiza el transcriptoma del tejido tumoral para verificar cuales neoantígenos predichos son altamente expresados [15].

#### 5.1.3.2. Selección de candidatos a neoantígenos

Los neoantígenos predichos pueden ser sintetizados y usados en su totalidad, sin embargo, el número de neoantígenos predichos suele ser bastante alto y la

evaluación sin filtro es de elevado costo. Por esta razón, los candidatos resultantes suelen ser tamizados por métodos que permitan seleccionar las epítopes con mayor potencial de ser inmunogénicos. Uno de estos métodos es la inmunopeptidómica basado en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con el propósito de seleccionar aquellos epítopes mutantes que se encuentran unidos a HLA de superficie del tumor, sin embargo, por su costo y elaborada técnica este no es sistemáticamente utilizado [49, 50]. Otro acercamiento es a través de algoritmos computacionales basados en redes neuronales, los cuales permiten predecir el procesamiento y presentación de estos en contexto de HLA para así dar una idea de la inmunogenicidad. Estas herramientas predicen la afinidad relativa de unión (IC50), el tiempo de unión o estabilidad en el HLA, procesamiento por proteasoma, transporte por TAP y reconocimiento por TCR [51, 52]. La predicción es de gran utilidad ya que permite priorizar los candidatos a neoantígenos para realizar la evaluación *in-vitro* de la respuesta antitumoral para posterior selección de epítopes para uso en inmunoterapia [53]. Por ejemplo, Nonomura *et al.* predijeron los neoantígenos de un paciente con melanoma donde inicialmente identificaron 1348 secuencias con mutaciones no sinónimas con un total de 21066 epítopes de 9 aminoácidos, no obstante, se sintetizaron 24 péptidos priorizando aquellos que tenían una mayor afinidad de unión al HLA del paciente [54].

A pesar de los recientes resultados de algunas investigaciones en materia de diseño de vacunas personalizadas, son pocos los estudios que demuestran inmunogenicidad en humanos, evidenciando un vacío en los métodos y parámetros que permiten identificar epítopes inmunogénicas. Pese al avance de las herramientas de predicción *in-silico*, estas aún pueden generar tanto falsos positivos como falsos negativos [55-58], lo cual se debe principalmente a dos factores: (i) las bases de datos con las que se entrenan la mayoría de estas herramientas suelen ser poco diversas en los alelos HLA a evaluar, y no tienen en cuenta resultados de las evaluaciones *in-vitro* o *in-vivo* de estos péptidos [59]; (ii) Las herramientas de predicción no incorporan satisfactoriamente aspectos moleculares del procesamiento y presentación del epítope por las células presentadoras de antígeno, tal como la estabilidad del complejo péptido-MHC (pMHC) y el

reconocimiento del complejo MHC-péptido por el TCR del linfocito T, factores determinantes para la inmunogenicidad de los antígenos [60].

#### 5.1.4. Evaluación de inmunogenicidad *in-vitro*

La presentación del péptido en el HLA ha demostrado ser necesaria pero no suficiente para el reconocimiento de los LT, por lo tanto, las herramientas *in-silico* aún no son suficientes para determinar la inmunogenicidad de los neoantígenos. Por tal razón, es necesario realizar la evaluación de la inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos candidatos para poder seleccionar aquellas epítopes reactivas con potencial de generar una respuesta antitumoral *in-vivo* [61-63]. Para que un neoantígeno sea inmunogénico, este tiene que ser altamente expresado, tener la correcta localización subcelular para entrar al proteasoma, ser transportado al retículo endoplasmático y cargado en la molécula HLA con una alta afinidad para así ser eficientemente presentado al LT y generar una respuesta antitumoral específica [17, 24].

Los ensayos realizados para este propósito usan un sistema de cultivo *in vitro* que comprende las células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) y los LT respondedores. Para el caso de estos últimos, se puede usar una de las siguientes tres poblaciones celulares provenientes de los pacientes: TILs, PBMCs o LT enriquecidos a partir de PBMCs [17, 64]. El ensayo se fundamenta en la entrega del neoantígeno a las APCs para que estas lo procesen y presenten a los LT. Una vez presentado se debe evaluar el reconocimiento del LT por medio de técnicas directas, como lo es la tecnología basada en multímeros [65, 66], o técnicas indirectas como medir la funcionalidad de los LT mediante producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o expresión de marcadores de activación como CD137, CD69 o CD25 [37, 67]. Sin embargo, la prueba definitiva para asegurar que el neoantígeno genera una respuesta antitumoral específica es mediante ensayos *in-vitro* en los cuales los LT neoantígeno específicos logran destruir las células tumorales del paciente [15]. No obstante, la evaluación de los neoantígenos con las células de los pacientes muestra una frecuencia de respuestas baja, ya que solo un 1.2% de los

péptidos con potencial inmunogénico pueden ser espontáneamente reconocidas en los pacientes [17].

Es por lo anterior que la identificación de neoantígenos que pueden ser blancos relevantes para la inmunoterapia pueden estar subestimados cuando son evaluados en el repertorio de LT de los pacientes. Esto puede ser explicado bajo dos razones: (i) La enfermedad per se y los tratamientos de quimio y radioterapia hace que los pacientes con cáncer sean más propensos a tener un SI alterado y por ende generar una respuesta antitumoral insuficiente para su evaluación [22, 68]. Tres conceptos que ocurren naturalmente en la respuesta antitumoral pueden explicar este fenómeno. Primero, existe una delección clonal que lleva a un bajo número de LT con un TCR de baja afinidad hacia los antígenos WT o del tumor. Segundo, un sistema inmune innato con una estimulación y *priming* ineficiente. Tercero, los LT están inhibidos en el microambiente tumoral por señales inhibitorias lo cual induce su agotamiento [20, 69]. (ii) El repertorio de TCR no cubre la secuencia del neoantígeno [17].

Una alternativa para superar este obstáculo fue propuesta por Strønen *et al.* en el 2016 en la cual se implementó un sistema de tamizaje de los neoantígenos por medio de PBMCs de donantes sanos para evaluar el reconocimiento de neoantígenos predichos de 3 pacientes con melanoma. Este estudio reveló el reconocimiento de 10 neoantígenos en los donantes que en cambio no fueron reconocidos en los TILs de los pacientes. Posteriormente lograron obtener la secuencia del TCR específico para dichos neoantígenos y transducirlo en LT de los donantes donde se observó una respuesta antitumoral al enfrentarlo con las células de melanoma del paciente. Adicionalmente, realizaron ensayos de estabilidad *in-vitro* encontrando que aquellos neoantígenos inmunogénicos estaban unidos por más de 5 horas a la molécula de HLA-A2 [22]. En el 2019 este mismo grupo presentó un protocolo para la inducción de LT reactivos a neoantígenos a partir de LT vírgenes de donantes sanos [70] .

Este acercamiento es prometedor ya que el repertorio de donantes sanos no solo provee un medio para identificar neoantígenos con relevancia para estrategias

terapéuticas como la vacunación, sino también puede llevar a la identificación de TCR reactivos a neoantígenos para realizar terapias génicas basadas en la modificación genética de los LTs de los pacientes con estos TCR y así generar una respuesta antitumoral dirigida para el uso de terapia adoptiva de células. [71, 72]. Esta clase de inmunoterapia con TCRs obtenidos a partir de donantes sanos ha sido utilizada para ensayos clínicos de terapia adoptiva de células con TCR específicos para antígenos asociados a tumor como WT1 y MAGE-A4 en pacientes con AML y cáncer esofágico, respectivamente [73, 74]

## **5.2. Consideraciones acerca de los sistemas de cultivo para la expansión de LT CD8+ neoantígeno específico con fines de inmunoterapia.**

Inicialmente los ensayos para evidenciar la respuesta de los LTs neoantígeno específicos se basaban en la evaluación *ex-vivo* de la producción de citoquinas ante la exposición al péptido. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de células antígeno-específicas en las muestras, especialmente en PBMCs, se empezaron a implementar sistemas de cultivo para expandir dicha población y así tener una mayor resolución de la respuesta. No obstante, esta estrategia no permite identificar los LT neoantígeno específicos ni obtener información sobre el fenotipo de memoria y el estado funcional de estos, por tanto, se empezó a utilizar la tecnología basada en multimeros que permite la identificación 1 en 5000 LT antígeno específicos y a su vez analizar las poblaciones de memoria y marcadores de activación y agotamiento de estas células [75, 76].

Los primeros sistemas de cultivo *in-vitro* implementados se basaron en el uso de PBMCs con el péptido en un medio suplementado con IL-2 para evaluar la existencia de precursores de LT neoantígeno específicos [77]. Posteriormente, se fueron desarrollando diferentes protocolos para inducción y expansión de LT antígeno específico mediante el cocultivo de DCs y fracciones enriquecidas de LT CD8+ totales o poblaciones vírgenes en medios suplementados con diferentes combinaciones de citoquinas de la familia de la cadena gamma común [78, 79]. Los sistemas de cultivo con sólo la IL-2 demostraron una expansión de los LT a expensas de un fenotipo de memoria terminalmente diferenciado, e inducción de

células reguladoras, sugiriendo una respuesta antitumoral insuficiente de corto plazo [80].

Por lo anterior, la cantidad de LTs neoantígeno-específicos no es lo único que se debe tener en cuenta sino también el funcionamiento, diferenciación y capacidad de homing, por lo cual se introdujeron las siguientes citoquinas a los sistemas de cultivos: i) IL-7 al ser un factor de supervivencia que induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 mediando la homeostasis de las LT CD4+ y CD8+ vírgenes y de memoria [81]; ii) IL-15 por su papel en la expansión y mantenimiento en un fenotipo de memoria central en los LT CD8+ [82] y iii) IL-21 importante para el *priming* inicial, debido a que puede incrementar el número total de LT CD8+ antígeno específico enriqueciendo la población de alta afinidad, ayuda el desarrollo y mantenimiento de la memoria central de los linfocitos T [83], y además las células expandidas utilizando esta citoquina han mostrado una mayor capacidad antitumoral que las resultantes con IL-2 [79]. Adicionalmente, se ha observado que el uso de las tres citoquinas en conjunto tiene un efecto sinérgico en la expansión de LT CD8+ antígeno específicos con fenotipos de memoria menos diferenciados, los cuales han demostrado conferir protección inmune efectiva a corto y largo [78].

Por otra parte, se ha visto la importancia de evaluar el estado funcional después de la expansión con estimulación de antígeno, ya que especialmente altas dosis del estímulo resultan en la regulación a la alta de receptores co-inhibitorios (RI) como PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y KLRG1, entre otros, así como en la obtención de LT CD8+ menos polifuncionales [84]. En el 2013 Legant *et al.* demostraron que la expresión de RI se correlaciona fuertemente con la diferenciación de LT [85]; sin embargo, la co-expresión de múltiples RI está asociada con la disfunción de LT, ya que la expresión de estos tiene una fuerte relación con una menor producción de citoquinas, característica clásica de un fenotipo agotado [84]. La expresión de estos receptores puede afectar en el momento de la respuesta inmune ya que los RI se pueden unir a sus respectivos ligandos expresados por las APC y las células cancerígenas en el microambiente tumoral impidiendo así el funcionamiento de los LT [86].



Las diferentes características fenotípicas y funcionales de las células expandidas han demostrado ser de suma importancia para proveer una adecuada protección inmune duradera. Por lo tanto, se buscan sistemas de expansión *in-vitro* que promuevan la generación de grandes cantidades de LT específicos para un antígeno con un fenotipo menos diferenciado y en un estado funcional activo con fines de uso en ACT.

### **5.3. Métodos computacionales para el estudio de interacciones péptido-proteína**

Las interacciones entre péptidos y proteínas son cada vez más estudiadas debido al rol que tienen estas en diversos procesos a nivel celular y molecular [87]. Con el fin de estudiar estas interacciones se han desarrollado métodos computacionales que permiten predecir las estructuras de complejos péptido-proteína y describir las interacciones atómicas entre estos como lo son los puentes de hidrogeno, puentes salinos y enlaces hidrofóbicos [88]. Este tipo de análisis computacional de las interacciones es vital en el diseño de fármacos asistido por computadora, así como en la comprensión de los procesos bioquímicos fundamentales en los que están involucrados [89, 90].

Dentro de los métodos computacionales desarrollados se encuentran las herramientas de docking molecular y dinámica molecular, las cuales han permitido estudiar las interacciones atómicas entre proteínas a nivel de residuos, cargas, enlaces, fuerzas de interacción, entropía y entalpia. Estas técnicas empezaron a ser utilizadas a finales de la década de los 70 con el fin de simular los complejos de unión sencillos pero su desarrollo ha permitido estudiar las interacciones más complejas en diversos escenarios como las interacciones antígeno-anticuerpo, ligando-receptor, sustrato-enzima, resaltando su importancia en la identificación de candidatos a medicamentos [91].

#### **5.3.1 Simulaciones de la interacciones péptido-proteína por docking molecular y dinámica molecular**

El docking molecular es una metodología computacional que busca principalmente encontrar la posición óptima para un ligando en el sitio de unión de una proteína

blanco, permitiendo resolver las conformaciones tridimensionales entre dos o más estructuras que interactúan [92]. El enfoque docking molecular de complejos proteína-ligando es el método más común para el descubrimiento y diseño de fármacos *in-silico* [93]. Adicionalmente, se han desarrollado técnicas específicas para la predicción de la conformación de complejos péptido-proteína, en el campo de péptidos de uso terapéutico. Actualmente, se ha logrado un amplio rango de aplicaciones de docking entre péptidos y proteínas, incluyendo inhibidores, diseño de péptidos que interfieren interacciones proteína-proteína y péptidos con potencial para ser utilizados en vacunación [94-96].

Con la intención de incluir la flexibilidad de las proteínas durante el modelamiento clásico por docking molecular, se dio el desarrollo de tecnologías y métodos computacionales como la dinámica molecular. La dinámica molecular es una técnica computacional poderosa que permite simular la dinámica de movimiento de todos los átomos de una biomolécula en función del tiempo [97], lo que proporciona una visión molecular de la flexibilidad del sistema, así como una visión dinámica de las interacciones intermoleculares cuando la simulación se realiza en complejos de dos o más moléculas. Las simulaciones de dinámica molecular se basan en calcular el campo de fuerza molecular, el cual se logra mediante la evaluación de la energía potencial del sistema así como de las interacciones intramoleculares e intermoleculares [98]. Como resultado de la simulación se logra obtener una “película” tridimensional que describe la configuración a nivel atómico de un sistema durante el intervalo de tiempo de la simulación. Esta herramienta se ha utilizado para refinar la mejor pose de unión de péptidos en proteínas obtenida por docking molecular, sin embargo, la dinámica molecular requiere de maquinaria computacional mucho más avanzada, obteniendo resultados mucho más finos pero en un lapso de tiempo mayor [99, 100].

Estas simulaciones pueden ser utilizadas en una amplia variedad de procesos celulares y moleculares importantes tales como el cambio conformacional, la unión de ligandos y el plegamiento de proteínas, al igual que predecir cómo responderán biomoléculas a nivel atómico a modificaciones como mutaciones, fosforilación,

protonación o la adición o eliminación de un ligando [100]. Por lo tanto es posible realizar simulaciones de dinámica molecular de proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-membrana y ácido nucleico-proteína, entre otros.

### **5.3.2 Herramientas computacionales para estudiar la especificidad de unión de péptidos a moléculas MHC.**

Clásicamente la predicción de la especificidad de unión en los complejos péptido-proteína, como es el caso de antígenos y el complejo mayor de compatibilidad (MHC), se ha basado principalmente en la secuencia del péptido. Este enfoque se enfoca exclusivamente en las características de la secuencia de aminoácidos del antígeno para determinar la especificidad de este al MHC. Estos acercamientos requieren de datos experimentales de unión entre péptidos y MHC para entrenar redes neuronales, usando dos tipos de aproximaciones para determinar la afinidad de unión [88]. La primera aproximación asume que cada residuo del péptido independientemente confiere una afinidad/estabilidad del complejo péptido-MHC. La segunda se basa en la definición de motivos de unión o patrones de reconocimiento dentro de la secuencia. Este método es computacionalmente eficiente y puede lograr evaluar rápidamente una amplia cantidad de secuencias peptídicas, pero ha evidenciado aún tener una alta tasa de falsos positivos y negativos debido a que la precisión de predicción depende en gran medida en el tamaño y diversidad de los sets de entrenamiento. Por ejemplo, la mayoría de las bases de datos predomina los datos para MHC-I más comunes y para péptidos de 9 aminoácidos quedándose cortos en la predicción en alelos y longitudes de péptidos menos canónicos [59]. Para estos casos se ha visto que tener en cuenta las características de la estructura del complejo péptido-MHC puede beneficiar la predicción de unión de antígenos al MHC.

Teniendo en cuenta esta observación, se empezaron a evaluar acercamientos basados en la estructura, lo cuales están enfocados en el modelamiento físico de diferentes secuencias en el contexto del receptor, y por lo tanto son capaces de generalizar más allá de un set de entrenamiento [101]. Estos métodos no requieren de datos experimentales de unión y permiten predecir la afinidad de unión de

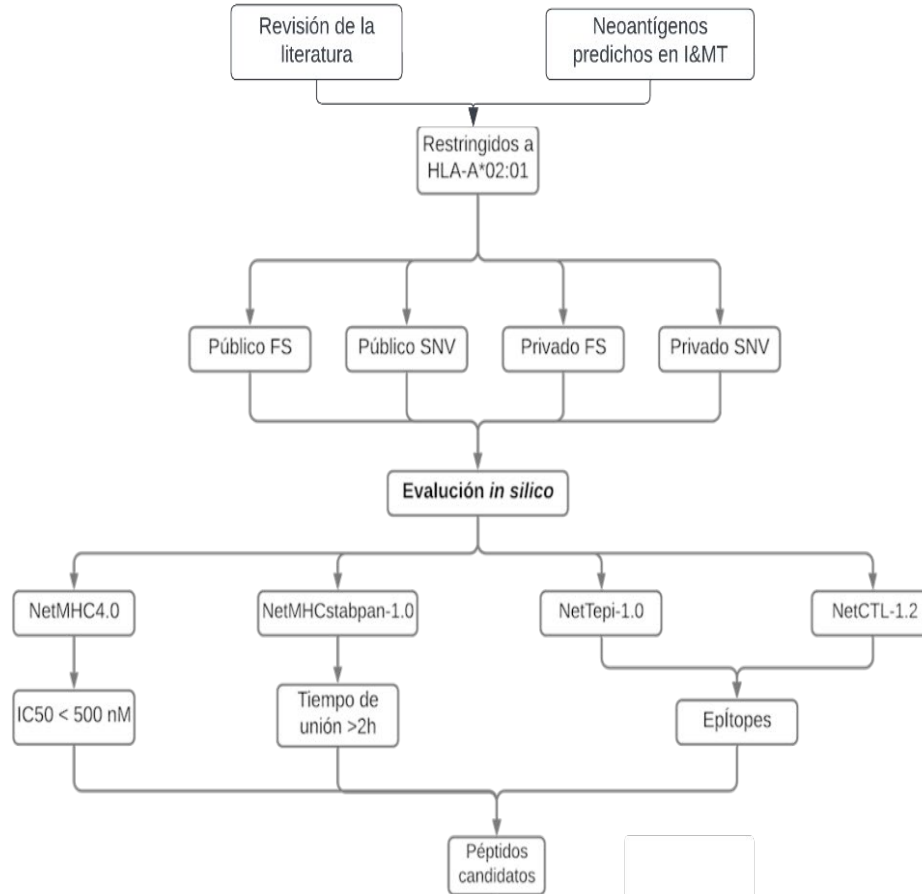
manera más refinada a nivel atómica mediante herramientas como el docking o la dinámica molecular. Gracias a estos nuevos acercamientos se han podido identificar antígenos virales afines a MHC en el virus de Hepatitis B [102] , Zika[103] y más recientemente SARS-CoV-2 [104]. En el caso de los neoantígenos este tipo de aproximación hasta ahora está siendo explorado con algunos resultados prometedores [105, 106].

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Resumen ejecutivo de la metodología

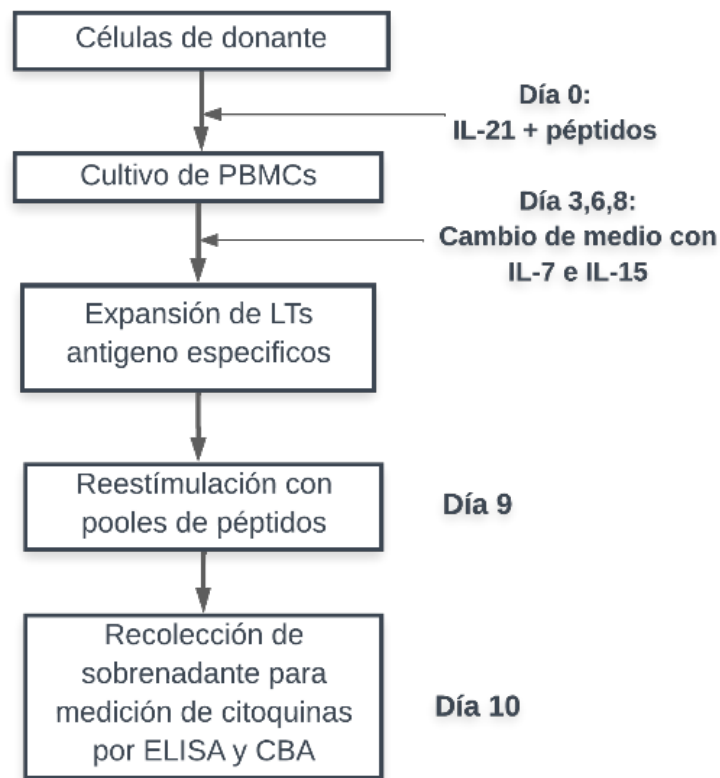
Con el fin de lograr los objetivos propuestos, el diseño experimental se dividió en las siguientes tres secciones:

1. La selección de neoantígenos cortos restringidos a HLA-A\*02:01 se realizó mediante la revisión de la literatura y en la base de datos de neoantígenos predichos por el grupo I&MT. La lista final de neoantígenos contenía al menos una secuencia peptídica para cada una de las siguientes categorías: i) público FS, ii) público SNV, iii) privado FS, y iv) privado SNV. Estos antígenos fueron evaluados *in-silico* por herramientas que permitían analizar la afinidad y estabilidad de unión relativa a HLA-A\*02:01, al igual que predecir si son epítopes que pueden ser reconocidas por los LT (Figura 4). Teniendo en cuenta estos parámetros junto con los resultados de la evaluación de la inmunogenicidad *in-vitro* en los estudios originales, se seleccionó una lista de 13 neoantígenos a sintetizar y cuatro antígenos A2 control (dos virales: CMV y FLU; dos antígenos asociados a tumor: MELAN-A y NY-ESO1). La afinidad de unión de los péptidos seleccionados fue evaluada *in-vitro* mediante un ensayo de unión utilizando células T2.



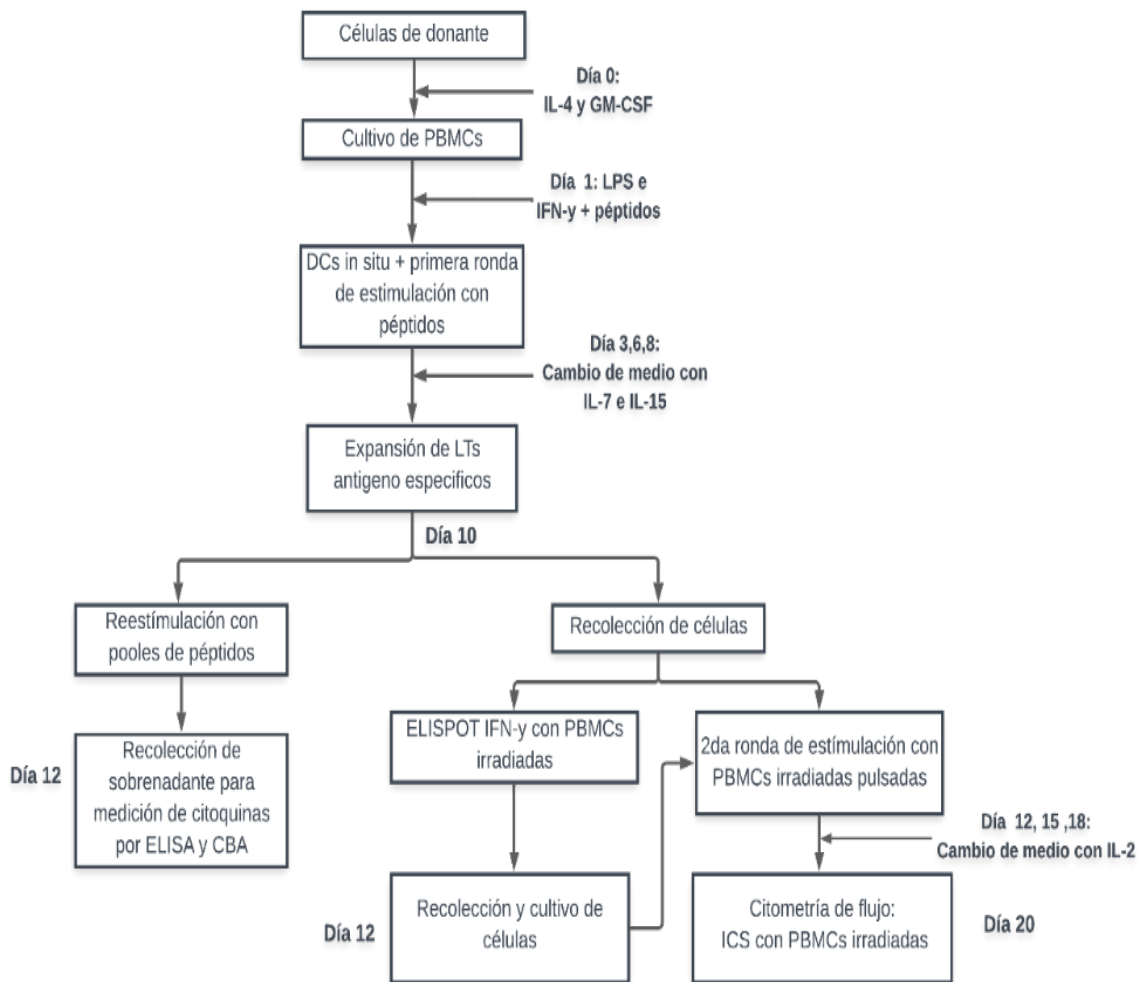
**Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de selección de los neoantígenos**

2. Se evaluaron 4 sistemas de cultivo diferentes orientados a detectar y caracterizar los LT CD8 específicos contra los neoantígenos seleccionados. El primer sistema de cultivo utilizó PBMCs totales, las cuales fueron pulsadas con los péptidos y suplementadas con las citoquinas IL-21, IL-7 e IL-15 durante 9 días seguido de estimulación con los péptidos y evaluación de la respuesta de citoquinas medidas por ELISA y CBA (Figura 5).



**Figura 5. Diagrama de flujo del primer sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pooles de péptidos**

El segundo sistema de cultivo utilizó el cocultivo acelerado de células dendríticas (acDCs). Este consiste en la obtención de DCs *in-situ* con la adición de IL-4, GM-CSF y maduración con IFN- $\gamma$  y LPS a partir de los monocitos en las PBMCs totales. Estas DCs fueron pulsadas con los péptidos a ser presentados a los LT CD8 respondedores en el cultivo. El cocultivo fue suplementado con IL-21, IL-7 e IL-15 durante 10 días, momento en el cual una fracción de las células fueron reestimuladas con los péptidos y se midió la secreción de citoquinas por ELISA, CBA y ELISPOT. Las células remanentes, fueron sometidas a una segunda ronda de estimulación con PBMCs autólogas irradiadas pulsadas con antígeno y suplementadas con IL-2 durante 10 días adicionales. En el día 20 estas fueron reestimuladas con APCs autólogas irradiadas y pulsadas con los péptidos y la respuesta evaluada por la medición de citoquinas intracelulares por citometría de flujo (Figura 6).

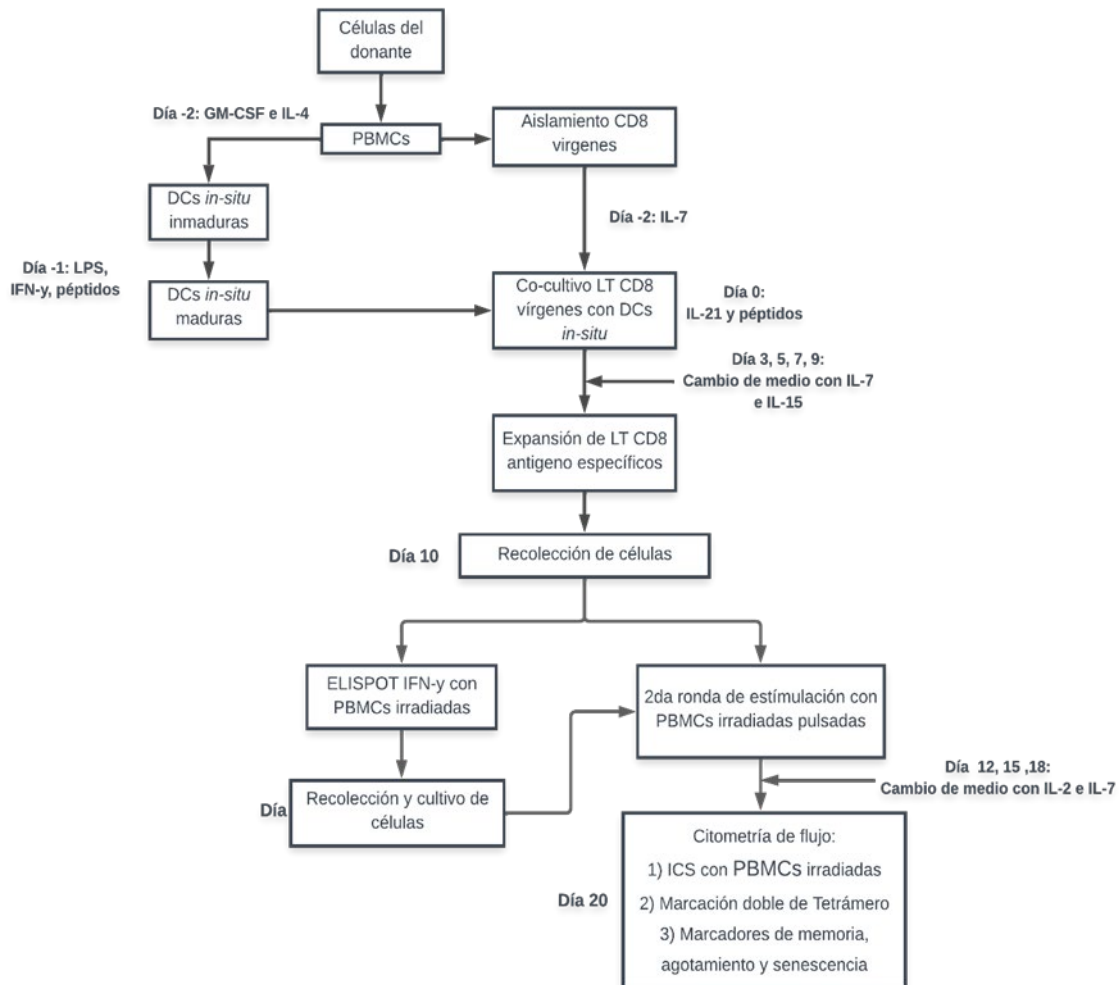


**Figura 6. Diagrama de flujo del segundo sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos**

El tercer sistema de cultivo radica en el cocultivo de LT CD8 vírgenes y DCs *in-situ* pulsadas con los péptidos. Las células fueron cultivadas en presencia de IL-21, IL-7 e IL-15 durante 10 días, momento en el cual una fracción de las células fueron evaluadas por ELISPOT, mientras que la otra fracción fue sometida a una segunda ronda de estimulación durante 10 días adicionales con PBMCs irradiadas autólogas y pulsadas con los péptidos y en presencia de IL-2. En el día 20 las células fueron reestimuladas con APCs pulsadas con los péptidos para evaluar la respuesta por la medición de citoquinas intracelulares por citometría de flujo. Aquellas células

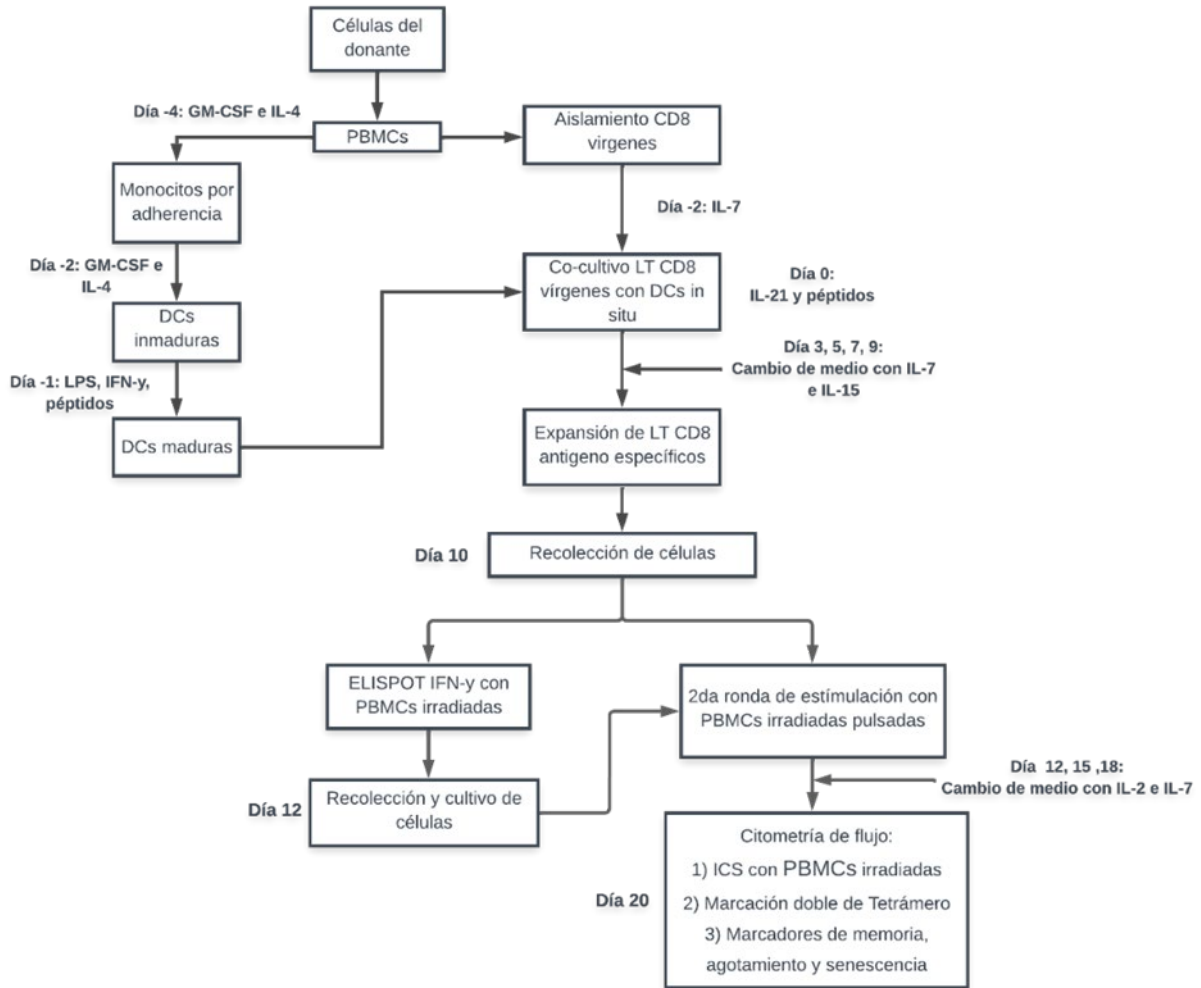


respondedoras a los péptidos eran marcadas con tetrámero y evaluado su fenotipo de memoria y marcadores de agotamiento por citometría de flujo (Figura 7)



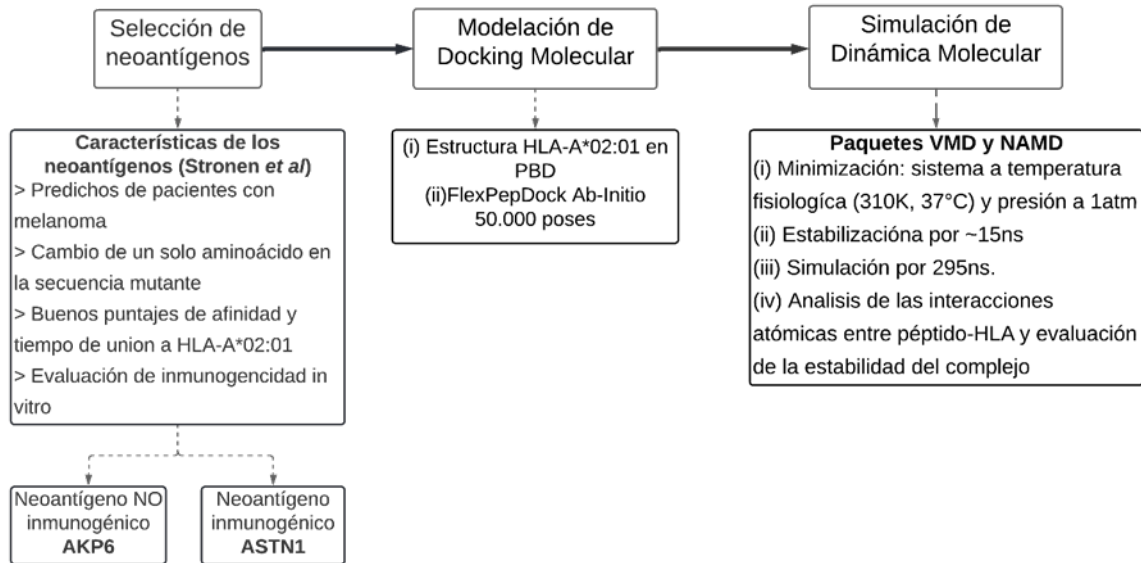
**Figura 7. Diagrama de flujo del tercer sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos.**

El cuarto y último sistema de cultivo fue similar al tercero, pues solo varió la forma de obtención de las DCs, ya que en este caso se realizó un protocolo de 4 días que incluía la adherencia de monocitos y cultivo de las células adherentes en presencia de dos dosis de IL-4 y GM-CSF (Figura 8).



**Figura 8. Diagrama de flujo del cuarto sistema de cultivo junto con los ensayos realizados para evaluar la respuesta a los pools de péptidos.**

3. La modelación de docking molecular y simulación por dinámica molecular se realizó con las secuencias de los péptidos ASTN1 y AKPK6 [22], dos neoantígenos y sus contrapartidas silvestres, de los cuales se conoce resultados de inmunogenicidad tanto en pacientes como en donantes sanos. La modelación por docking de los péptidos con el HLA-A\*02:01 se realizó mediante la plataforma FlexPepDock *ab initio* donde se evaluaron 50.000 poses diferentes. Una vez obtenida la mejor pose generada *in-silico*, se llevó a cabo la simulación de la interacción por dinámica molecular para analizar las interacciones péptido-proteína y evaluar la estabilidad del complejo (Figura 9).



**Figura 9. Diagrama de flujo para la modelación y simulación por docking y dinámica molecular**

## 6.2 Metodología detallada y actividades para alcanzar cada objetivo específico

### 6.2.1 Objetivo específico 1: Implementar un sistema de cultivo que permita evidenciar el reconocimiento de diferentes tipos de neoantígenos tumorales por Linfocitos T CD8+ de donantes sanos.

#### Actividad 1: Selección de los neoantígenos.

Se realizó una revisión de la literatura y una búsqueda en la base de neoantígenos predichos del grupo I&MT, enfocándose en péptidos cortos (8-10 aminoácidos), restringidos a la molécula HLA\*A: 02:01 con información previa de evaluación de la inmunogenicidad *in-vitro*. Posteriormente, las secuencias de estos neoantígenos, junto con sus contrapartidas silvestres (WT), según el caso, fueron analizadas por diferentes herramientas *in-silico* (NetMHC-4.0, NetMHCstabpan-1.0, NetTepi-1.0, NetCTL-1.2) que determinan los parámetros de afinidad, estabilidad, procesamiento, presentación y reconocimiento por el TCR, parámetros importantes que permiten predecir la inmunogenicidad y generación de una respuesta mediada por LT CD8+. Basados en la respuesta de inmunogenicidad *in-vitro* reportados en los artículos originales, así como los resultados de las herramientas *in-silico*, se

priorizaron aquellos neoantígenos con una respuesta positiva *in-vitro* y una afinidad de unión a HLA-A\*02:01 < 500 nM por NetMHC-4.0, estabilidad o tiempo de vida media en HLA-A\*02:01 > 2 horas por NetMHCstabpan-1.0, y que fuesen considerados como un epítipo para el programa NetTepi-1.0 y/o NetCTL-1.2. Adicionalmente, en el proceso de selección se tuvo en cuenta que hubiese al menos dos péptidos para cada una de las siguientes 4 categorías: (i) público FS, (ii) público SNV, (iii) privado FS, y (iv) privado SNV. Una vez se estableció la lista de neoantígenos estos fueron sintetizados con su correspondiente secuencia silvestre según el caso por la compañía 21st Century Biochemicals. Los péptidos fueron reconstituidos en 4% de DMSO y agua destilada estéril.

### Actividad 2: Ensayo de unión a T2.

El ensayo de unión a T2 se fundamenta en el uso de la línea celular T2, la cual expresa la molécula HLA-A\*02:01 en su superficie, carecen de MHC-II y tienen una deficiencia de TAP que le impide presentar péptidos endógenos afines a este alelo. Esta deficiencia puede suplirse con la adición exógena de un péptido que le confiere estabilidad a la molécula, el cual restituye la expresión en superficie de la molécula HLA-A\*02:01 y puede ser evidencia por citometría de flujo [107]. Se siguió el protocolo descrito por Kessler *et al.* [108] con algunas modificaciones. Células T2 fueron descongeladas y cultivadas en medio IMDM a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pozo en platos de 96 pozos en fondo plano. Se evaluaron 3 concentraciones diferentes de péptido (6,25  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M). Además del péptido, las células fueron cultivadas en presencia de 3  $\mu$ g/ml de  $\beta$ 2-microglobulina humana en el medio durante 16 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, para medir los niveles de HLA-A2 en la superficie, las células fueron lavadas y marcadas con anti-HLA-A2 (BB7.2, PE, Biolegend). El índice de fluorescencia proporcional al grado de expresión en superficie de la molécula fue calculado de la siguiente manera:

$$IF = \frac{MFI \text{ de PE con el péptido} - MFI \text{ de PE sin el péptido}}{MFI \text{ de PE sin el péptido}}$$

El péptido NLVPMVATV (CMV pp65 495-503) restringido a HLA-A\*02:01 fue utilizado como control positivo, mientras que el péptido RTLFMARRK (MMG) restringido a HLA-A\*11:01 se usó como control negativo.

*Actividad 3: Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos HLA-A\*02:01.*

Las células con las que se desarrolló el presente estudio se obtuvieron a partir de unidades de *Buffy coat* de donantes jóvenes sanas/os entre 18 y 36 años provenientes del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS). A dichas unidades se les realizó un tamizaje rápido por citometría de flujo mediante el anticuerpo anti HLA-A2 (BB7.2, PE, Biolegend). Solo las unidades positivas en esta prueba fueron procesadas para el aislamiento de PBMCs por gradientes de densidad mediante centrifugación. Previo al procesamiento se colocó 25 µL de muestra por quintuplicado en tarjetas Protein Saver 903 Whatman®, las cuales fueron enviadas para tipificación HLA-A de alta resolución (2x Exones 2 y 3) por la compañía Histogenetics LLC.

Para el procesamiento de las muestras, las células fueron lavadas con solución salina al 0.9% con el fin de eliminar el anticoagulante, luego se retiró el plasma y la fracción celular se resuspendió en medio RPMI. Posteriormente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas mediante la separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep (Stemcell). Una vez obtenida esta fracción, se verificó la viabilidad y el número absoluto de células por recuento con cámara de Neubauer por dilución con azul de tripano. Estas células fueron almacenadas a una concentración de  $3-5 \times 10^7$  células/vial en nitrógeno líquido, en un medio de congelación consistente de 50% AIMV, 40% suero fetal bovino y 10% dimetil sulfóxido (DMSO).

*Actividad 4: Primer sistema de cultivo: PBMCs totales.*

Con el fin de evaluar todos los neoantígenos de una manera rápida y eficiente, estos fueron divididos en tres diferentes pooles:

Neo 1: PÚBLICOS	
APC-FS	LQMDFLVHPA
NPM1-FS	CLAVEEVSL
TGFBRII-FS	RLSSCVPVA
KRAS-SNV	KLVVVGAVGV
TP53-SNV	HMTEVVRHC

Neo 2: PRIVADOS	
DHX40 <sup>b</sup> -FS	ILMHGLVSL
USF3- FS	FLIRWIILT
CDK4-SNV	ALDPHSGHFV
ASTN1- SNV	KLYGLDWAEL

Neo 3: PRIVADOS	
CDC73-SNV	NIFAILESV
EXOC8-SNV	IILVAVPHV
SEC24A-SNV	FLYNLLTRV
POM121-SNV	SLPTAVPTA

Adicionalmente, se definió como control de péptidos un pool de antígenos modelo restringidos al alelo HLA-A\*02:01 (denominado en adelante pool A2), el cual incluía dos antígenos virales de los virus influenza A y citomegalovirus (en adelante denominados FLU y CMV) y dos antígenos asociados a tumor (MELAN-A y NY-ESO1) [109, 110], cuyas secuencias se describen a continuación:

Pool A2	
FLU <sub>M158-66</sub>	GILGFVFTL
MELAN-A	ELAGIGILTV
CMV <sub>pp65 495-503</sub>	NLVPMVATV
NY-ESO1 <sub>157-165</sub>	SLLMWITQV

El primer sistema de cultivo consistió en ensayos *in-vitro* con PBMCs totales criopreservadas de ocho donantes. Estas fueron descongeladas en baño serológico a 37°C, contadas y cultivadas en platos de 96 pozos fondo redondo en una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/pozo en medio AIM-V suplementado con IL-21 (30 ng/mL) y pulsados o no con los diferentes pools de péptidos a 10 µg/mL. El cultivo se incubó a 37°C durante 72h, pasado este tiempo se cambió el medio cada dos días con medio fresco suplementado con IL-7 (5 ng/mL) e IL-15 (5 ng/mL). En el noveno día se reestimuló con el pool de péptidos a 10ug/mL por péptido según el tratamiento durante 24h y el cóctel de activación (25ng/mL de PMA y 1ug/mL de Ionomicina; Biolegend) como control positivo. Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes de cada uno de los tratamientos con el fin de realizar un ensayo de ELISA para la detección de IFN-γ (ELISA Ready-SET-Go!®, Invitrogen) y CBA para

la detección de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, BD Biosciences).

Actividad 5: Segundo sistema de cultivo: Cocultivo acelerado de células dendríticas (acDCs).

El siguiente sistema de cultivo a evaluar fue el cocultivo de células dendríticas acelerado a partir de PBMCs, que en adelante se denominará acDCs. Este consistió en la generación de DCs *in-situ* en las PBMCs por medio de la derivación y maduración de los monocitos presentes en las células totales. Para ello, se siguió el protocolo especificado por Martinuzzi [111] y Kuranda [112], con algunas modificaciones. Se descongelaron PBMCs y se sembraron en AIMV a una densidad  $1 \times 10^6$  células/pozo en platos de 96 pozos fondo redondo. En el Día 0 las células fueron estimuladas con IL-4 (500U/mL; Cellgenix) y GM-CSF (1000U/mL; Biolegend). En el día 1 se agregó el coctel de maduración consistente de LPS (10ng/mL, Merck) e IFN- $\gamma$  (100U/mL, BD Biosciences), al igual que se añadió IL-21 (30ng/mL; Cellgenix) y se pulsó con los pools de péptidos a una concentración de 10ug/mL por péptido. En el día 3 se reemplazó la mitad del medio con AIM-V suplementado con IL-7 (5ng/mL; Biolegend) e IL-15 (5ng/mL; Biolegend). Los cambios de medio fueron realizados cada 2-3 días con AIM-V suplementado con 5ng/mL de IL-7 y 5ng/mL de IL-15. En el día 10 del cultivo se realizaron diversos ensayos, una fracción de las células fueron reestimuladas con los pools de antígenos durante 24 horas con el fin de realizar una prueba de ELISPOT para cuantificar células productoras de IFN- $\gamma$  (Immunospot, CTL) y se recolectó el sobrenadante para evaluar la secreción de citoquinas por ELISA, CBA y ELISPOT (Immunospot, CTL). La segunda fracción de células fue sometida a una segunda ronda de estimulación que consistía en la adición de IL-2 (100U/mL; BD Biosciences) y PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con cada uno de los pools de antígenos durante 10 días adicionales. En el día 20, se evaluó la detección de LT CD8 secretores de citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por medio de la tinción intracelular de citoquinas por citometría de flujo (ICS).

Actividad 6: Tercer y cuarto sistema de cultivo: Cocultivo de células dendríticas con LT CD8 vírgenes purificados.

El tercer y cuarto sistema de cultivo se fundamentó en el cocultivo de LT CD8 vírgenes purificados con células dendríticas (DCs) variando entre estos el protocolo de obtención de las DCs utilizadas para el cocultivo. El tercer sistema de cultivo uso DC *in-situ*, las cuales fueron obtenidas mediante el protocolo de acDCs con algunas modificaciones. Se descongelaron PBMCs y se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/pozo en platos de 12 pozos con AIM-V suplementado con GM-CSF (1000U/mL) e IL-4 (500U/mL) durante 24h, luego estas células fueron estimuladas con LPS (10ng/ml), IFN- $\gamma$ (100U/mL) y el pool A2 o el pool de neoantígenos (10ug/mL por péptido) durante 24h, momento en el cual se lavó 3 veces la fracción no adherente con PBS 1X a 37°C y posteriormente se inició el cocultivo con LT CD8 vírgenes purificados.

En el cuarto sistema de cultivo se llevó a cabo el protocolo de obtención de DCs derivadas de monocitos de cuatro días (moDCs) descrito por Wölf *et al.* en el 2014 [70] con algunas modificaciones. Se descongelaron PBMCs y se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/pozo en platos de 12 pozos y se incubaron por 2 horas para permitir la adherencia de los monocitos al plato. Pasado dicho tiempo se lavó la fracción no adherente con PBS a 37°C y se adicionó medio AIM-V suplementado con IL-4 50 U/mL, GM-CSF 800 U/mL y se incubó durante 48 horas a 37°C. Finalizado dicho período se lavó la fracción no adherente nuevamente y se adicionó medio AIM-V fresco suplementado con IL-4 50 U/mL, GM-CSF 800 U/mL y se incubó durante 24 horas más a 37°C. Finalizado el tercer día de cultivo se adicionaron los pools de péptidos (10ug/mL por péptido) y el cóctel de citoquinas de maduración, el cual contenía IL-4 (50 U/mL), GM-CSF (800 U/mL), LPS (10ng/mL) e IFN- $\gamma$  (100u/mL), y se incubó durante 24 horas a 37°C.

Al finalizar ambos protocolos, una alícuota de células fueron evaluadas por citometría de flujo para determinar la derivación y maduración de monocitos en cultivo a DCs maduras por medio de los siguientes marcadores: CD11c (APC, Biolegend), CD14 (FITC, Biolegend), CD80 (PE, Biolegend), CD83 (APC-Cy7,



Biolegend) y HLA-DR (PE-Texas Red, Biolegend). Para ello las células adherentes fueron recolectadas y teñidas con los anticuerpos a 4°C durante 20 minutos. Se hizo un lavado con PBS, se resuspendieron las células en 200 µl de PBS y se adquirieron los datos en un FACSAriaIIIu.

Paralelo a la obtención de DCs, se realizó el enriquecimiento de LT CD8+ vírgenes por medio un kit de perlas magnéticas de selección negativa (EasySep™ Human Naïve CD8+ T Cell Enrichment Kit, Stemcell). Para ello se descongelaron PBMCs y se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/mL en Buffer de separación (PBS, 2% SFB y 1mM EDTA) en un tubo de poliestireno de 5 ml de fondo redondo. Se agregaron 50 µl/ $5 \times 10^7$  células del cóctel de enriquecimiento y 50 µl/ $5 \times 10^7$  células del coctel de depleción para la separación de LT CD8 vírgenes (cóctel de anticuerpos biotinados contra otras poblaciones celulares: CD4, CD56, CD14, CD16, CD20 y CD45RO) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se agregó 50µl de perlas magnéticas acopladas a anti-biotina por cada  $5 \times 10^7$  células y se completó a un volumen final de 2,5 ml con el buffer de separación, incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán de separación. Pasado el tiempo de incubación, se invirtió el contenido del tubo del magneto en otro tubo de 5 ml, el cual fue nuevamente incubado a temperatura ambiente en el imán por otros cinco minutos. Luego, se recibió en un tercer tubo de 5 ml, y se obtuvo la fracción enriquecida. Por último, se lavó con medio AIM-V libre de suero y se contaron las células obtenidas de la fracción negativa, correspondiente a LT CD8 vírgenes. Las células antes y después del enriquecimiento fueron analizadas mediante citometría de flujo con los marcadores CD45RA (APC, Biolegend) y CCR7 (FITC, Biolegend) para monitorear el grado de enriquecimiento de los LT CD8+ vírgenes.

Una vez obtenidas las células vírgenes enriquecidas y las DCs maduras, se realizó el cocultivo de estas células en placas de 12 pozos en medio AIM-V suplementado con IL-21 (30ng/mL) durante las primeras 72h, posteriormente se realizó recambio cada dos días de medio fresco suplementado con IL-7 (5 ng/mL) e IL-15 (5 ng/mL). En este tipo de cultivo se realizaron dos tratamientos únicamente, células

estimuladas con el pool de A2 y estimuladas con pool de neoantígenos (Neo 1, 2 y 3). Este cultivo se extendió durante 10 días, momento en el cual una fracción de las células fueron reestimuladas con los pools A2, Neo 1, Neo 2 y Neo 3 por separado y la respuesta fue evaluada por medio de ELISPOT para cuantificar células IFN- $\gamma$ +. La otra fracción de las células fueron sometidas a otra ronda de estimulación con PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con los péptidos y suplementado con IL-2 (100U/mL) hasta el día 20. Finalizado este tiempo se recolectaron las células para hacer un ensayo de citoquinas intracelulares, tetrámero y caracterización del fenotipo de memoria y de la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia.

#### Actividad 7: Ensayo de ELISA para medición de IFN- $\gamma$

El sobrenadante de los cultivos procesados para la evaluación de activación medido por la producción de INF- $\gamma$  fue recolectado y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los platos para ELISA fueron recubiertos con anticuerpos anti- IFN- $\gamma$  durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (Invitrogen). Pasado este tiempo, los platos fueron lavados con buffer de lavado y bloqueado con solución diluyente por 1h a temperatura ambiente. Se preparó la curva estándar y se colocaron en el plato junto con los sobrenadantes a evaluar durante 2 horas. Posteriormente, se lavó con el buffer de lavado y se adicionó el anticuerpo de detección durante 1 hora. Luego se colocó la enzima HRP conjugada con estreptavidina durante 30 minutos luego de lo cual se colocó el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) durante 15 minutos. Por último, se añadió 100  $\mu\text{L}$  de 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para detener la reacción. Los platos fueron analizados en un lector de microplacas a una densidad óptica de 450nm.

#### Actividad 8: Medición de citoquinas en sobrenadante por CBA

Los sobrenadantes de los diferentes cultivos y donantes se descongelaron y diluyeron 1/1 en PBS antes de la incubación con perlas de CBA recubiertas con anticuerpos anti-IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kit CBA Th1/Th2 II; BD Biosciences). Las perlas se lavaron y se tiñeron con el anticuerpo secundario conjugado con PE. Las concentraciones de cada citoquina en los sobrenadantes se analizaron utilizando el software FCAP array v3 (BD Biosciences).

Actividad 9: Medición de IFN- $\gamma$  por ELISPOT para la evaluación de respuesta ante reestimulación con péptidos.

Una vez se finalizó el primer ciclo de estimulación con los péptidos, una fracción de las células fueron usadas para evaluar la respuesta de estas ante un reestímulo con los péptidos mediante ELISPOT de IFN- $\gamma$  (Immunospot, CTL). Para ello se recolectaron las células del cultivo, se contaron y se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pozo por duplicado por tratamiento. Para realizar el estímulo se usaron PBMCs autólogas irradiadas pulsadas durante 16h con los pools de antígenos (10ug/mL), las cuales fueron cocultivadas con las células del cultivo en el plato de ELISPOT en una proporción 1:2 (PBMCs irradiadas: células del cultivo) durante 44-48h. Como control positivo se utilizaron perlas magnéticas acopladas a anti CD2/CD3 y CD28 (Miltenyi Biotech). Pasado este tiempo, el sobrenadante de las células sembradas en el plato de ELISPOT fue recolectado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los platos fueron lavados 2 veces con PBS y dos veces con Buffer de lavado antes de adicionar el anticuerpo de detección durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego los platos fueron lavados 3 veces con Buffer de lavado antes de adicionar la enzima AP-HRP durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Por último, los platos fueron lavados 2 veces con Buffer de lavado y dos veces con agua destilada antes de agregar e incubar durante 15 minutos en la oscuridad con la solución azul de revelado, la cual contiene el sustrato para la enzima. Finalmente, la reacción fue detenida lavando 3 veces con agua y el plato secado en la cabina de flujo laminar durante 2 horas.

Una vez la placa se secó, se tomaron fotos de cada uno de los pozos en el estereoscopio. Los parámetros de nitidez, brillo y contraste de las fotos fueron modificados mediante el programa ImageJ con el fin de obtener una imagen de 8 bits a blanco y negro que permitiera distinguir los spots. Finalmente, se utilizó la herramienta de análisis de partículas de este mismo programa para cuantificar los spots.

Actividad 10: Medición de citoquinas intracelulares por citometría de flujo.

PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas fueron usadas como células presentadoras en el ensayo de tinción de citoquinas intracelulares por citometría de flujo (ICS). Para ello, PBMCs fueron descongeladas y pulsadas por 16h con los diferentes pools de péptidos a una concentración final de 10ug/mL por péptido a 37°C. Luego, las células fueron irradiadas por un ciclo a 25 Gy (BIOBEAM 2000) y marcadas a una concentración 1:500 de Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE; Biolegend). Después de marcadas, las PBMCs irradiadas fueron cocultivadas con las células provenientes del cultivo en una proporción 1:1 a una densidad de 200.000 células en placas de 96 pozos fondo redondo. Para evaluar la especificidad de la respuesta, se tuvo como control negativo el cocultivo de las células del cultivo con PBMCs autólogas irradiadas sin pulsar, mientras que como control positivo se usó el cóctel de activación (25ng/mL de PMA y 1ug/mL de Ionomicina; Biolegend). Pasada 1.5 horas desde el cocultivo, se adicionó 5ug/mL de Brefeldina A (Biolegend) en el medio de cultivo y se continuó incubado a 37°C hasta completar las 6 horas de estimulación. Una vez pasado este tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el marcador de viabilidad (Zombie Violet™ Fixable Viability Kit, Biolegend). La marcación con los anticuerpos de superficie se realizó durante 20 minutos con los siguientes anticuerpos: anti-CD8 (PE/Dazzle594, Biolegend), anti-CD3 (Brilliant Violet 510, Biolegend). Se prosiguió con la fijación y permeabilización de las células para la tinción intracelular. Las células se fijaron y permeabilizaron con el kit de Intrastain (DAKO), y para la marcación intracelular se usaron los siguientes anticuerpos: anti-TNF- $\alpha$  (APC, Biolegend) y anti-IFN $\gamma$  (PE o PercP, Biolegend). Las células se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, se lavaron con 1 mL de PBS durante 7 minutos a 700g, se resuspendieron en 200 uL de PBSE y se adquirieron al menos 30.000 eventos por experimento en un citómetro FACSAriaIIIu. Los datos fueron analizados en el Software FlowJo para determinar los LT CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> en la población de células Zombie Violet<sup>-</sup> CFSE<sup>-</sup>.

#### Actividad 11: Evaluación del reconocimiento mediante tetrámero.

La identificación de LT CD8 neoantígenos específicos se realizó mediante la marcación con tetrámeros HLA-A\*02:01 ensamblados *in-situ* con los neoantígenos

(Tetramershop). Para ello, los tetrámeros vacíos fueron cargados con cada uno de los péptidos a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  por 30 minutos a 4°C. Una vez ensamblados los tetrámeros, las células fueron recolectadas de los cultivos y marcadas durante 15 min a 37°C con dos tetrámeros con fluorocromos diferentes (Brilliant Violet 786 y Brilliant Violet 650; Tetramershop) cada uno cargado con un antígeno distinto. Posteriormente las células fueron teñidas con un marcador de viabilidad (Zombie Violet™ Fixable Viability Kit, Biolegend) y con los marcadores de superficie anti -CD3 (Brilliant Violet 510, Biolegend) y anti-CD8 (PE-Texas red, Biolegend) por 30 minutos a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación las células se lavaron con 1 mL de PBS durante 7 minutos a 700g, se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de PBS y se adquirieron al menos 50.000 eventos por experimento en un citómetro FACSAriaIIIu. Los datos fueron analizados en el Software FlowJo para determinar los LT CD8 tetrámero positivos.

### **6.2.2 Objetivo específico 2: Caracterizar el fenotipo de memoria y la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia de los Linfocitos T específicos contra estos neoantígenos.**

#### **Actividad 12: Caracterización del fenotipo de memoria y expresión de marcadores de agotamiento.**

En aquellos donantes en que se evidenciaron LTs CD8 tetrámero positivas se caracterizó el fenotipo de memoria y expresión de correceptores inhibitorios para evaluar el agotamiento. Para ello, las células tetrámero-positivas se marcaron con los siguientes anticuerpos que reconocen marcadores de superficie: anti-CD45RA (APC, Biolegend), -CCR7(FITC, Biolegend), -PD-1(PERCP Cy5.5, Biolegend), -LAG3 (PE, Biolegend), los cuales se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron usando el kit Intrastain (Dako) y se marcaron con el anticuerpo intracelular anti-CTLA4 (PE-Cy7, Biolegend) durante 20 minutos a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación las células se lavaron con 1 mL de PBS durante 7 minutos a 700g, se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de PBS y se adquirieron al menos 50.000 eventos por experimento en un citómetro FACSAriaIIIu (BD). Los datos fueron analizados en el Software FlowJo para determinar el fenotipo de memoria de las células y la co-expresión de los

marcadores de agotamiento tanto en la población total como en las poblaciones de memoria mediante análisis booleanos.

### 6.2.3 Objetivo específico 3: Analizar los aspectos moleculares y estructurales de las interacciones entre neoantígenos y MHC (Complejo péptido-HLA).

#### Actividad 13: Modelación de docking molecular y simulación de dinámica molecular

Basándose en el estudio de Strønen et al. [22], se seleccionaron dos neoantígenos y sus contrapartidas silvestres con las siguientes características: i) Cambio de un solo aminoácido en secuencia mutada, ii) Buenos puntajes de afinidad (<500nM según NetMHC 4.0) y tiempo de unión (>5 horas según los ensayos de estabilidad del artículo original) a HLA-A\*02:01, iii) Disponibilidad de resultados de evaluación de inmunogenicidad *in-vitro*. Teniendo en cuenta estas características, se eligieron los neoantígenos asociados a los genes ASTN1 (10 aminoácidos de longitud) como neoantígeno inmunogénico y AKAP6 (9 aminoácidos de longitud) como neoantígeno no inmunogénico, ambos restringidos al alelo HLA-A\*02:01 (Tabla 1).

**Tabla 1: Secuencias de los péptidos seleccionados para el presente estudio.** Se resalta en rojo las posiciones en donde se ubican las mutaciones de los neoantígenos respecto a sus contrapartidas silvestres.

Gen	Secuencia neoantígeno	Secuencia silvestre
ASTN1	KLYGLDWAE <b>L</b>	KPYGLDWAE <b>L</b>
AKAP6	WLIDM <b>K</b> SLV	WLIDM <b>E</b> SLV

Las secuencias de los cuatro péptidos fueron analizadas por medio de la herramienta NetMHC 4.0 para la evaluación de afinidad relativa de unión a HLA-A\*02:01, NetMHCstabpan 1.0 para la estabilidad de unión al MHC-I y NetCTL 1.2 para determinar si estos péptidos son considerados epítopes para linfocitos T citotóxicos teniendo en cuenta procesamiento por proteasoma, transporte por TAP y unión a HLA [36, 37].

Con el fin de generar el modelo del complejo péptido-HLA para cada caso se realizó docking molecular. Se utilizó la estructura 5C0G del Protein Data Bank (PDB) [113] como estructura de referencia para modelar el par de péptidos derivados de ASTN1 (silvestre y mutado). Mientras que para el par de péptidos derivados de AKAP6 se utilizó la estructura 5NMH. El protocolo FlexPepDock Ab-Initio [114] integrado en el paquete de Rosetta [115] se implementó el docking, en donde se calcularon 50.000 poses para cada péptido. De acuerdo con la función de puntuación de Rosetta, se seleccionó la mejor pose generada para cada péptido. El programa Chimera 1.16 fue utilizado para visualizar las estructuras.

Posteriormente se realizó una simulación de dinámica molecular para cada péptido por medio de las herramientas VMD [116] y NAMD [117]. Para la generación de la topología del sistema se utilizó la herramienta AutoPSF de VMD [116] junto al campo de fuerza CHARMM36 [118], el sistema fue solvatado utilizando el modelo de solvente explícito TIP3P, el tamaño de la caja de agua fue de 67x70x70 Å<sup>3</sup>, se neutralizó el sistema utilizando la herramienta Autolionize de VMD [116], el método Particle Mesh Ewald (PME) se utilizó para el cálculo de la energía electrostática con una distancia de truncamiento de 11 Å. La simulación se llevó a cabo bajo condiciones NPT es decir presión (1 atm) y temperatura (310 K) constantes y se compuso de 3 etapas: (i) minimización en el cual se llevó el sistema a temperatura ambiente (310K), (ii) estabilización del sistema por ~15ns y (iii) la simulación propiamente dicha con una duración de 295ns. Con el fin de facilitar la visualización y el acceso a los resultados generados, se depositaron los datos en el web server 3Drs [119] y en el repositorio Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.5772726>). Por último, se usaron las herramientas VMD [116] y Pycontact [120] para analizar las interacciones péptido-proteína y evaluar la estabilidad del complejo.

### **6.3 Colección y análisis de datos**

La información obtenida de citometría de flujo fue analizada con la herramienta FlowJo (Trestar). Los resultados fueron organizados en una base de datos conteniendo los porcentajes de las diferentes poblaciones y la intensidad de fluorescencia media (MFI) con la media geométrica de cada marcador. Los datos

fueron normalizados basados en los cultivos control. La representación gráfica de los resultados y los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software Graphpad Prism 6. Los análisis del ensayo de estabilidad en T2 y ELISA se realizaron mediante una ANOVA y posterior y Kruskal-Wallis teniendo como comparador el control negativo o las células sin estimular, respectivamente.

## **7. Resultados**

### **7.1 Primer objetivo**

#### **7.1.1 Características de los neoantígenos seleccionados**

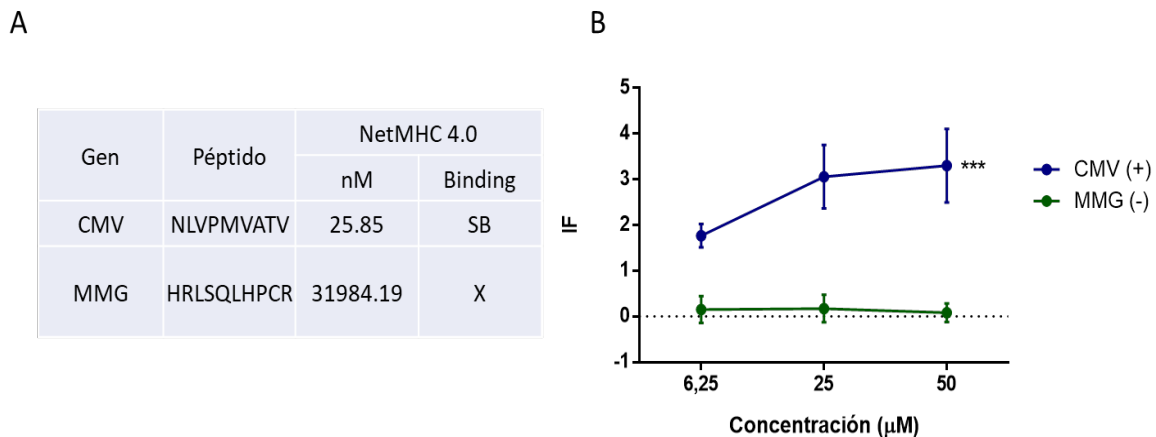
La selección de los neoantígenos fue realizada mediante una revisión de la literatura en la cual se buscaron artículos que hubiesen evaluado la inmunogenicidad, ya sea en pacientes o en donantes sanos, de péptidos cortos restringidos para HLA-A\*02:01. En primera instancia, se realizó un tamizaje de los artículos teniendo en cuenta los resultados de inmunogenicidad reportados. Luego, se clasificaron según el tipo de mutación que generó el neoantígeno y según el espectro de cubrimiento de estos mismos, para así quedar con al menos dos péptidos seleccionados por categoría. Adicionalmente se escogieron dos neoantígenos predichos en el grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) de la Universidad Nacional de Colombia. En total se seleccionaron 13 neoantígenos categorizados de la siguiente manera: (i) tres públicos FS, (ii) dos públicos SNV, (iii) dos privados FS y (iv) 6 privados SNV. Las secuencias de estos neoantígenos se evaluaron mediante diferentes herramientas *in-silico*, las cuales tienen la capacidad de analizar los parámetros de afinidad, estabilidad, procesamiento, presentación y reconocimiento por el TCR, con el objetivo de predecir la inmunogenicidad y la generación de una respuesta mediada por LT CD8+. En la Tabla 2, se encuentra la información de los neoantígenos seleccionados respecto a su secuencia, el tipo de mutación, el artículo de procedencia, y el tipo de tumor en que se predijo, por otra parte los resultados de la evaluación *in-silico* de los péptidos, la frecuencia mutacional y la evaluación de la inmunogenicidad reportados por los artículos originales se encuentran en el Anexo 1. Los neoantígenos seleccionados fueron sintetizados junto con su contrapartida silvestre según el caso.



**Tabla 2. Descripción general de los neoantígenos seleccionados.**

Tipo de Neoantígeno	Artículo original	Gen	Secuencia peptídica	Tipo de mutación	Tipo de tumor
Público FS	Saeterda <i>et al.</i> [33] Inderberg <i>et al.</i> [32]	TGFBRII	RLSSCPVA	FS	Cáncer colorrectal
	van der Lee <i>et al.</i> [31]	NPM1	CLAVEEVSL	FS	Leucemia mieloide aguda
	Koster <i>et al.</i> [34]	APC	LQMDFLVHPA	FS	Cáncer colorrectal
Público SNV	Chen <i>et al.</i> [42] Choi <i>et al.</i> [121]	KRAS	KLVVVGAVGV	G/V	Cáncer de páncreas, cáncer de ovario, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de intestino largo
	Lo <i>et al.</i> [122] Malekzadeh <i>et al.</i> [123]	TP53	HMTEVVRHC	R/H	Cáncer colorrectal, cáncer de estómago y cáncer de páncreas
Privado FS	Ott <i>et al.</i> [11]	DHX40b	ILMHGLVSL	FS	Melanoma
	I&MT	USF3	FLIRWIILT	FS	Cáncer de mama
Privado SNV	Strønen <i>et al.</i> [22] Ali <i>et al.</i> [70]	CDK4	ALDPHSGHFV	R/L	Melanoma
		ASTN1	KLYGLDWAEL	P/L	Melanoma
	Carreno <i>et al.</i> [12]	SEC24A	FLYNLLTRV	P/L	Melanoma
		EXOC8	IILVAVPHV	Q/P	Melanoma
	I&MT	POM121	SLPTAVPTA	P/H	Cáncer de mama
	Chen <i>et al.</i> [42]	CDC73	NIFAILESV	Q/E	Timoma

Una vez se obtuvieron los péptidos estos fueron utilizados para determinar la afinidad relativa de unión *in-vitro* mediante ensayos de unión a moléculas A2 expresadas por células T2. Este ensayo se basa en el uso de la línea celular T2, la cual es HLA-A\*02:01 y deficiente en TAP, y por ende permite evaluar si los péptidos se unen a dicho alelo [107].

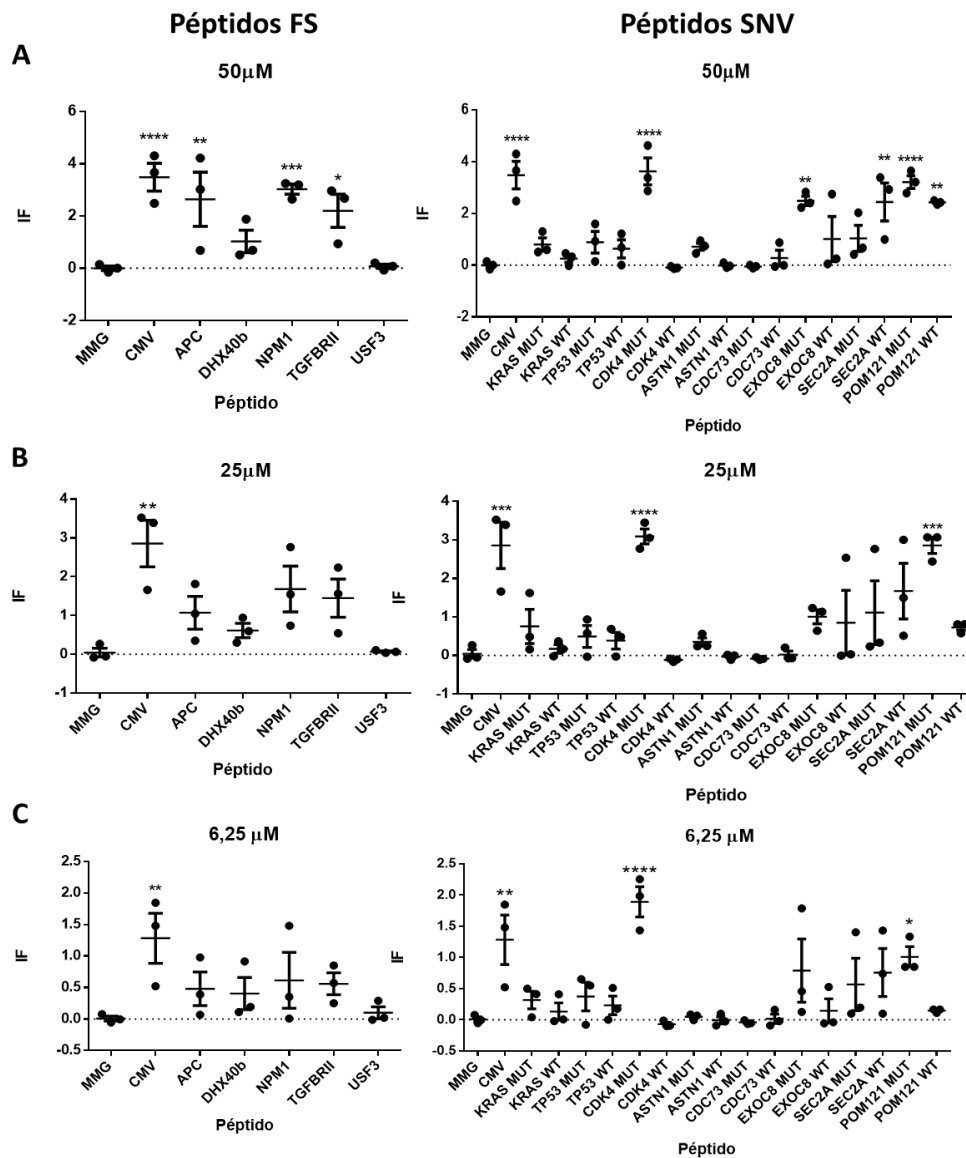


**Figura 10. Estandarización del ensayo de afinidad a T2.** Los péptidos CMV y MMG fueron utilizados como péptidos control positivo y negativo, respectivamente, para estandarizar el ensayo de afinidad a células T2. (A) Las secuencias de los péptidos y la afinidad relativa de unión predicha mediante NetMHC 4.0 evidenció que la secuencia del péptido CMV tiene una alta afinidad y MMG una nula afinidad. (B) Ensayo de afinidad a T2 con tres concentraciones diferentes para estos dos péptidos demuestra la afinidad de CMV a HLA-A2. IF: índice de fluorescencia calculado teniendo en cuenta los valores de MFI tanto de las células sin pulsar como de las células pulsadas con los péptidos. n=3. Las barras corresponden al promedio + SEM. \*\*\*<0.0001.

La estandarización de la prueba se realizó con dos péptidos, el péptido viral CMV que funcionaba como control positivo y el neoantígeno MMG como control negativo dado los resultados de la predicción *in-silico* (Figura 10A). Estos péptidos funcionaron según lo establecido y su unión era dependiente de la concentración (Figura 10B), por lo que se decidió continuar con la evaluación de los neoantígenos y sus contrapartidas silvestres en tres concentraciones diferentes (50µM, 25µM y 6,25µM).

Al comparar los valores de índice de fluorescencia (IF) de los neoantígenos con el control negativo, se encontró que, para la mayor concentración evaluada, los péptidos APC, NPM1, TGFBR2, CDK4-mut, EXOC8-mut, SEC2A-WT, POMP121-mut y POMP121-WT tienen un índice de fluorescencia significativamente mayor, lo que quiere decir que a esa concentración se unen a HLA-A\*02:01 (Figura 11A). Este

mismo análisis se realizó para 25 $\mu$ M y 6.25 $\mu$ M, encontrando que solo para el caso de CDK4-mut y POM121-mut se mantuvo una diferencia significativa con respecto al control negativo (Figura 11B y C). Por lo tanto, se puede evidenciar que en estos ensayos, tan solo 6 de los 13 neoantígenos se unen a HLA-A\*02:01 a una alta concentración y solamente 2 a bajas concentraciones (Tabla S1). Este ensayo pone en evidencia que hay cierto grado de variación en la predicción *in-silico* de la unión a HLA con respecto a los ensayos *in-vitro*, pues algunas epítopes que se predecían con una alta afinidad de unión a la molécula A2, no parecen unirse a dicho alelo a una concentración de al menos 50uM.



**Figura 11. Ensayo de medición de afinidad de unión relativa de los neoantígenos seleccionados a la molécula A2 utilizando células T2.** Los 13 neoantígenos seleccionados fueron evaluados en este ensayo de afinidad en tres concentraciones diferentes, (A) 50 $\mu$ M, (B) 25 $\mu$ M y (C) 6.5  $\mu$ M. En la parte izquierda se encuentran graficados los resultados del índice de fluorescencia de los neoantígenos FS, mientras que en la derecha presentan los resultados de péptidos SNV junto con su contrapartida WT. n=3. Las barras corresponden al promedio + SEM. \*\*\*<0.0001. \*\*<0.001. \*<0,05.

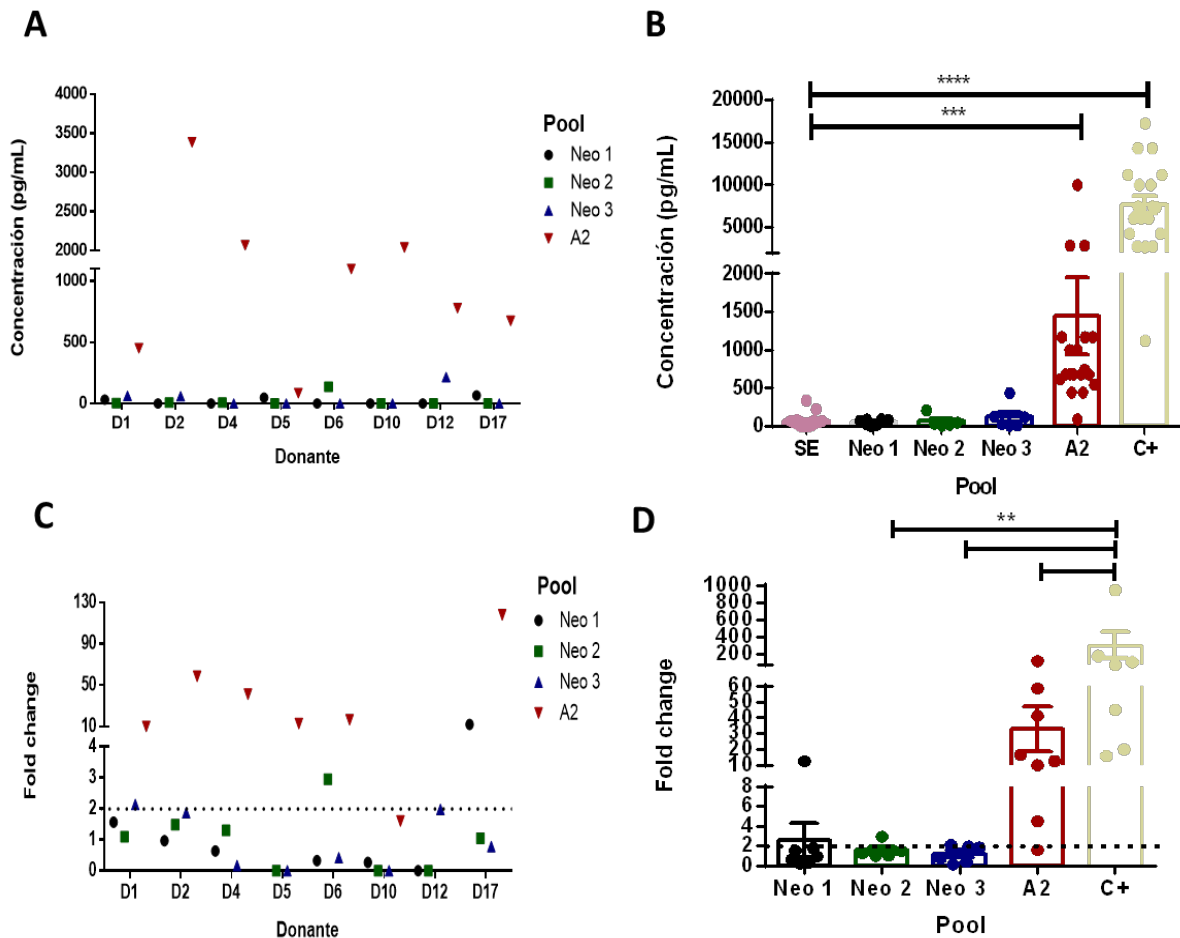
### 7.1.2 Primer sistema de cultivo: PBMCs totales permiten identificar la respuesta solo a péptidos modelo.

Después del tamizaje de 40 unidades de sangre, se logró obtener un banco de células de 18 donantes de 18 a 36 años, HLA-A\*02:01 tipificadas a alta resolución. La lista de los donantes junto con su edad, sexo y la tipificación fina de HLA-A para ambos alelos se encuentra especificada en la tabla S2.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Chamucero et al [124], en que evidenció que el sistema de cultivo con PBMCs totales junto con la combinación de IL-7, IL-15 e IL-21 permitía la expansión de LT específicos contra ELA y CMV, se comenzó con este sistema de cultivo para la detección de LT neoantígeno específicos. Los 13 neoantígenos se dividieron en 3 pooles (Neo 1, Neo 2 y Neo 3) y se incluyó un pool adicional con péptidos modelo restringidos a HLA-A\*02:01 como control de péptidos (A2). Las PBMCs de los donantes 1, 2, 4, 5, 6, 10, 12 y 17 fueron cultivadas en presencia o no de los pooles de péptidos en medio suplementado con IL-21 durante 72 horas y posteriormente se hizo cambio de medio fresco con IL-7 e IL-15 los días 3, 5 y 7. Al término del día 9 las células fueron reestimuladas con los pooles de péptidos para evaluar la respuesta a las 24h en el sobrenadante del cultivo mediante la secreción de IFN- $\gamma$  por ELISA y de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 por CBA. Los resultados evidenciaron que hubo una alta secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células estimuladas con el pool de A2 en 7/8 de los donantes evaluados (Figura 12A y tabla S3A). Cuando los resultados de todos los donantes eran analizados en conjunto, la concentración de IFN- $\gamma$  para el pool de A2 y el control positivo eran significativamente mayor con respecto al control negativo (Figura12B). Adicionalmente, se realizó el cálculo de las veces de incremento (“*Fold Change*”) de las concentraciones de las citoquinas por cada uno de los pooles con respecto a las

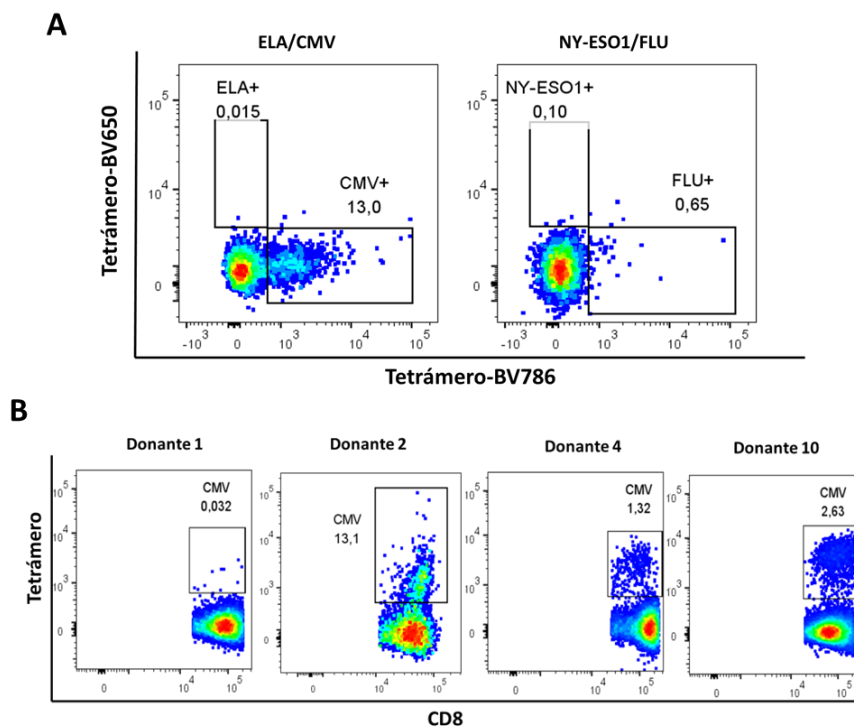
células sin estímulo (resultados positivos fueron definidos como aquellos con una tasa de cambio mayor a 2). Similar a lo observado anteriormente, todos los donantes a excepción del donante 5 muestran una respuesta positiva para el pool de A2 tanto por ELISA como por CBA (Figura 12C y tabla S3B), sin embargo, cuando el *Fold Change* de A2 se compara en conjunto de todos los donantes, este no es significativo con respecto a los otros pools (Figura 12D). En el caso de los neoantígenos, el donante 1, 6 y 17 tienen un *Fold Change* positivo para el pool Neo 3, Neo 2 y Neo 1 respectivamente (Figura 12A, 12C y Tabla S3).

Es importante destacar que el *Fold Change* puede dar idea de un cambio, no obstante, los valores obtenidos por la ELISA y CBA para los pools de neoantígenos son inferiores a los 60 pg/mL, por lo cual de manera general se encontró una respuesta discreta, contrario a lo detectado para el pool de antígenos modelo A2.



**Figura 12. Secreción de IFN- $\gamma$  por PBMCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.** (A) Se determinó la concentración (pg/mL) de IFN- $\gamma$  mediante ELISA del sobrenadante de cultivos de PBMCs (re)estimulados con los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) en ocho donantes. (B) Comparación de la concentración para cada uno de los tratamientos tomando los datos de los 8 donantes en conjunto. (C) Se calculó el *Fold change* de la concentración con respecto a los valores obtenidos en el sobrenadante de células sin estimular, por cada uno de los donantes de manera individual y de todos los donantes por pool (D). n=8. Las barras corresponden al promedio + SEM. \*\*\*<0.0001. \*\*<0.001.

Este primer sistema de cultivo permitió detectar una respuesta predominante hacia el pool A2, lo cual indicó que el método de estimulación con péptidos y de evaluación permite detectar LT específicos de antígenos A2 restringido cuando estos son estimulados *in-vitro*. Teniendo en cuenta que el pool A2 estaba conformado por cuatro péptidos, se continuó con la deconvolución de este pool con el fin de determinar cuál(es) péptido(s) generaba(n) la respuesta. Para ello, se realizó de nuevo el cultivo de PBMCs del donante 2 con las citoquinas IL-7, IL-15 y IL-21, el cual presentó la mayor respuesta al pool de A2. Al finalizar los 9 días de cultivo las células fueron recolectadas y evaluada su especificidad mediante tetramero (Figura 1S), encontrando que las células CD8 son específicas predominantemente para CMV y en menor medida para FLU (13% vs 0,65%), los dos péptido virales presentes en el pool (Figura 13A). Al observar este alto porcentaje de células específicas para CMV en este donante, se decidió evaluar otros tres donantes para este epítipo, encontrando que dos de los tres donantes tenían un porcentaje de LT CD8+ CMV+ > 1%, por lo tanto, en total 3 de los 4 donantes presentan LT CD8+ específicos a CMV (Figura 13B). Para los donantes 1, 4 y 10 fue posible evaluar la presencia de LT CD8+ CMV+ en células que no habían sido estimuladas con el péptido, evidenciando que el sistema de cultivo permitía la expansión de estas células específicas a CMV (Figura S2). Estos resultados muestran la alta prevalencia de LT CD8+ para este epítipo viral, lo cual concuerda con la literatura que refiere a una alta seroprevalencia de CMV en países subdesarrollados [125, 126].



**Figura 13. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 a partir de PBMC totales estimuladas con el pool de péptidos en medio suplementado con IL-21, IL-7 e IL-15.** PBMCs totales de los donantes sanos fueron estimuladas o no con el pool de péptidos A2 (ELA, CMV, NY-ESO, FLU). El cultivo se suplementó con IL-21 (30 ng/mL) las primeras 72 horas y luego se adicionaron tres dosis de IL-7 e IL-15 (5 ng/mL cada una). Al día 9 del cocultivo se determinó la población CD8+ tetramero positiva para los péptidos de interés. A) Marcación de tetramero doble para las cuatro epítopes del pool para el donante 2. B) Marcación de tetramero para CMV para cuatro donantes sanos diferentes.

### 7.1.3 Segundo sistema de cultivo: El cocultivo acelerado de células dendríticas (acDCs) genera una mayor respuesta al pool de A2 y pools de neoantígenos.

El primer sistema de cultivo permitió evidenciar una respuesta predominante hacia los péptidos modelos A2, más exactamente a los péptidos virales, razón por la cual se decidió realizar un nuevo sistema de cultivo en busca de una mayor sensibilidad del ensayo *in-vitro* para detectar LT CD8+ específicos para epítopes A2 tumorales incluidos los neoantígenos. Debido a que los neoantígenos son péptidos tumorales, los LT CD8+ de donantes sanos que puedan responder a estos antígenos deben ser precursores vírgenes, los cuales requieren la presentación del antígeno por parte de células presentadoras profesionales (APCs) que permitan hacer un *priming in-vitro* eficiente [127, 128]. Con el fin de continuar con un sistema de cultivo sencillo

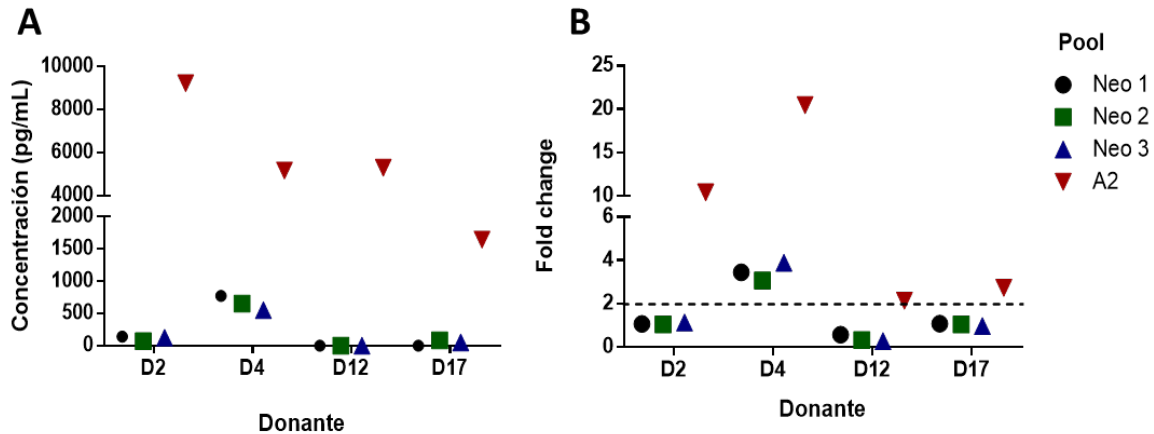
pero que incluyese APCs profesionales, se planteó el sistema de cocultivo acelerado de células dendríticas (acDCs), el cual es un tipo de ensayo que ha mostrado ser eficiente para la expansión y detección de LT CD8+ específicos para el péptido viral FLUMP58-66 [111] y el péptido asociado a tumor Melan-A26-35 [112], pero que su desempeño no ha sido reportado con neoantígenos.

Este tipo de cultivo es llamado así debido a que se induce la diferenciación y maduración de DC *in-situ* en PBMCs totales que se pulsan con los péptidos, en presencia de linfocitos T afines y en general otros leucocitos presentes en PBMCs totales. Con este sistema de cultivo se persigue que precursores de LT específicos de antígenos sean potentemente estimuladas de forma específica y se expandan de manera más eficiente. Este protocolo permite usar PBMCs completas sin ningún tipo de purificación preliminar de monocitos u otros precursores de DCs.

Para llevar a cabo este tipo de cultivo, las PBMCs totales fueron sembradas y estimuladas con IL-4 y GM-CSF para derivar los monocitos presentes a células dendríticas, madurarlas con LPS e IFN- $\gamma$  y pulsarlas con los pools de péptidos con el fin de obtener DCs maduras presentadoras de antígenos *in-situ*. Posteriormente, este cocultivo fue suplementado con IL-21 durante las primeras 72h, para luego realizar cambio de medio fresco con IL-7 e IL-15 los días 3, 5 y 7. En el día 9 las células fueron reestimuladas con los pools de antígenos durante 24h, momento en el cual se recolectó el sobrenadante para evaluar la secreción de citoquinas mediante ELISA y CBA. Este tipo de cultivo fue evaluado en los donantes 2, 4, 12 y 17, los cuales fueron seleccionados según los resultados obtenidos anteriormente ya sea para el pool de A2 o para los neoantígenos.

Se tuvieron en cuenta los mismos parámetros mencionados anteriormente para determinar si había una respuesta ante el reestímulo, encontrando así que para el caso del pool de A2 hubo un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$  comparado con el primer sistema de cultivo. En cuanto a los pools de neoantígenos, en 2/4 donantes (D2 y D4) se observa una respuesta para el pool Neo 3 mediante ELISA y/o CBA, la cual no fue evidente anteriormente con la mera estimulación con péptidos de las PBMCs en estos donantes (Figura 14 y Figura S3).

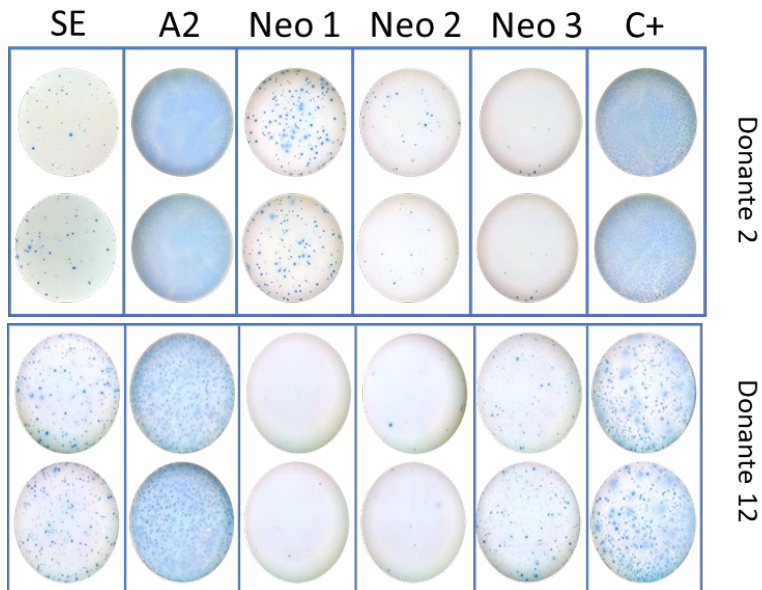




**Figura 14. Secreción de IFN- $\gamma$  en cultivo acDCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.** Se determinó la concentración (pg/mL) de IFN- $\gamma$  mediante ELISA del sobrenadante de cultivos de acDCs (re)estimulados alguno de los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) para los cuatro donantes (A). Se calculó el *Fold change* de la concentración con respecto a los valores obtenidos en el sobrenadante de células sin estimular para cada uno de los donantes (B). La línea punteada refleja un *Fold change* mayor a 2.

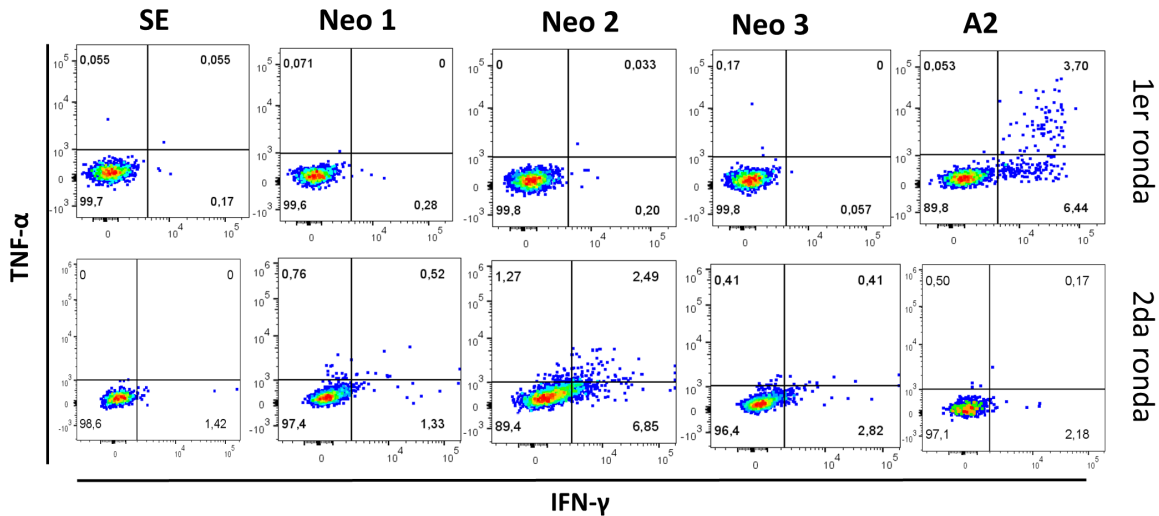
Con el fin de comprobar de una manera más fina la existencia de células respondedoras a los pools de neoantígenos, las células del donante 2 y el 12 fueron cultivadas nuevamente bajo el sistema de acDCs durante 9 días, luego fueron recolectadas, sembradas en la placa de ELISPOT y estimuladas durante 48h con PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con cada uno de los pools de péptidos. Como resultado, se obtuvo que para ambos donantes hubo una respuesta al pool de A2 y que para el caso del donante 2 hubo una leve respuesta al pool Neo 1, mientras que para el donante 12 se observa con el pool Neo 3 (Figura 15).

Debido a que las respuestas observadas tanto por ELISA como ELISPOT para los neoantígenos eran bajas, se llevó a cabo una segunda ronda de estimulación con PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con los pools de péptidos y suplementado con IL-2. Esto se realizó únicamente en el donante 2 y fue evaluado mediante la marcación de citoquinas intracelulares por citometría de flujo luego de reestimar las células al día 20 de cultivo. Para poder asegurar que la respuesta proviniese de las células originales del cultivo y no de las PBMCs irradiadas, estas últimas fueron marcadas con CFSE para poder así excluirlas durante el análisis por citometría de flujo. La estrategia de *gating* para la detección de las citoquinas intracelulares se puede observar en la figura S4.

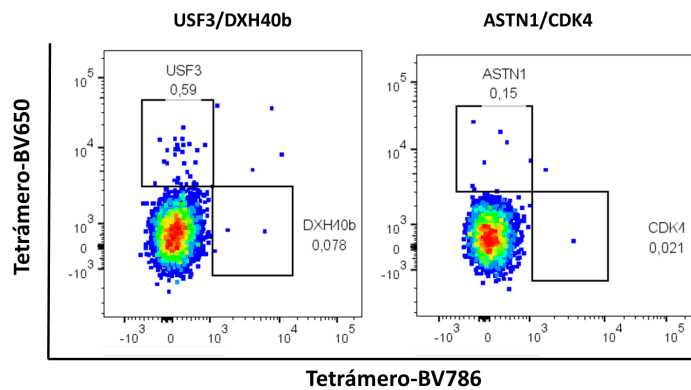


**Figura 15. Ensayo de ELISPOT de IFN- $\gamma$  en las células del cultivo de acDCs para los donantes 2 y 12.** Las células provenientes del acDCs después de 9 días de cultivo con los pools de antígenos fueron reestimuladas y evaluada la reactividad de las células a cada uno de los pools de péptidos presentados en PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con 10ug/mL por péptido. SE: PBMCs autólogas irradiadas sin ningún péptido. C+: Coctel de activación de PMA e Ionomicina.

Al comparar los resultados de solo una ronda de estimulación contra dos rondas, se observaron varios hallazgos. Por una parte, las células que respondían al pool de A2 en el día 10, parecen haber desaparecido en el segundo estímulo y esto se ve reflejado en la alta mortalidad de las células (Figura S5). Por otra parte, hubo un aumento en la cantidad de LT CD8+ secretores de citoquinas en respuesta al pool Neo 2 después de la segunda ronda de estimulación (%CD8 IFN- $\gamma$ +: 0,20% vs 6.85%) (Figura 16). Las células estimuladas con cada uno de los pools de neoantígenos fueron evaluadas mediante tetrámero, detectando la presencia solamente de LT CD8+ específicos para el neoantígeno USF3 (Figura 17 y Figura S6).



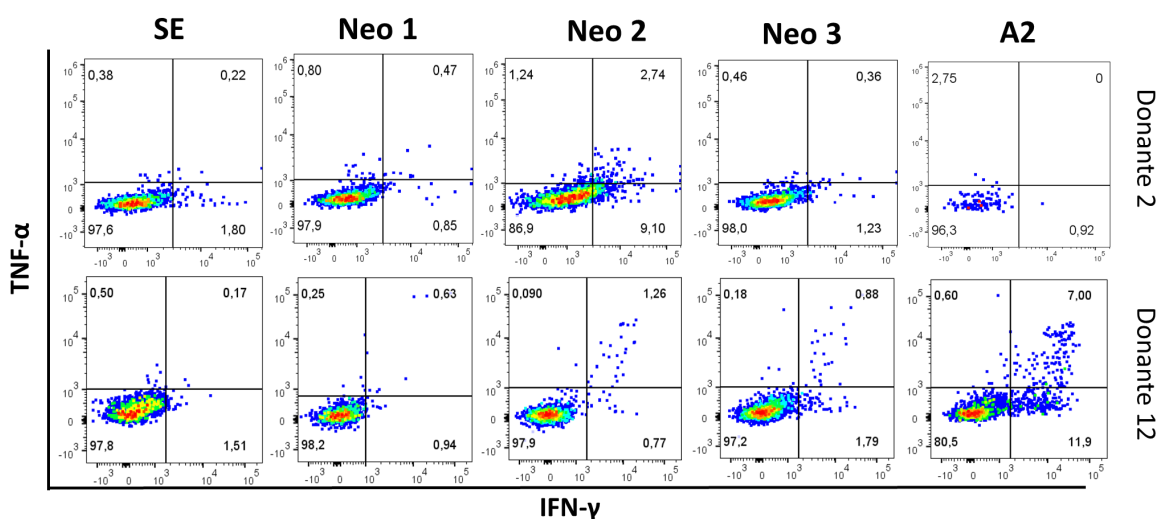
**Figura 16. Producción de citoquinas intracelulares después de una o dos rondas de estimulación con los pools de antígeno.** Las células provenientes del cultivo de acDCs del donante 2 fueron evaluadas después de una o dos rondas de estimulación con cada uno de los pools de antígenos mediante la producción de citoquinas intracelulares por citometría de flujo.



**Figura 17. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool Neo 2 a partir de cultivo acDCs.** Los LT CD8+ del donante 2 provenientes del cultivo de acDCs estimulados con el pool Neo 2 fueron marcados con tetrámeros cargados con cada uno de los péptidos provenientes del pool (DXH40b, USF3, ASTN1, CDK4).

Al observar que una segunda ronda de estimulación podría aumentar la respuesta al pool de neoantígenos, se ejecutó este mismo protocolo con el donante 12, en quien se reveló que después de dos ciclos de estimulación hubo un aumento en el porcentaje de LT CD8+ secretores de citoquinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) para el pool A2 y una discreta secreción de citoquinas para los pools de Neo 2 y Neo 3 comparado a las células sin estimular (Figura 18). Esto sugirió que una segunda estimulación

podría generar diferentes resultados dependiendo del tipo y cantidad de linfocitos respondedores. En caso del donante 2, previamente se determinó mediante el sistema de cultivo 1 que las células respondedoras al pool de A2 eran predominantemente LT CD8+ CMV específicos, los cuales al ser estimulados dos veces y suplementado con IL-2 en este segundo sistema de cultivo, presentaron una alta mortalidad, probablemente por tratarse de células con un fenotipo de memoria terminalmente diferenciadas (TEMRA) [129], así como se pudo observar posteriormente en el análisis de memoria (Figura 29). Por el contrario, en el caso de linfocitos respondedores a neoantígenos, al tratarse principalmente de células menos diferenciadas, este segundo estímulo y la adición de IL-2 pudo aumentar la cantidad de LT neoantígeno específicos [130], razón por la cual los ensayos subyacentes incluyeron dos rondas de estimulación.



**Figura 18. Producción de citoquinas intracelulares después dos rondas de estimulación con los pools de antígeno para dos donantes diferentes.** Las células provenientes del cultivo de acDCs de los donantes 2 y 12 fueron evaluadas después dos rondas de estimulación con cada uno de los pools de antígenos mediante la producción de citoquinas intracelulares por citometría de flujo.

#### 7.1.4 Tercer sistema de cultivo: El cocultivo de DCs *in-situ* con LT CD8 vírgenes

Teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos con el uso de acDCs, se propuso un nuevo sistema de cultivo con LT CD8+ vírgenes enriquecidas, en el cual se

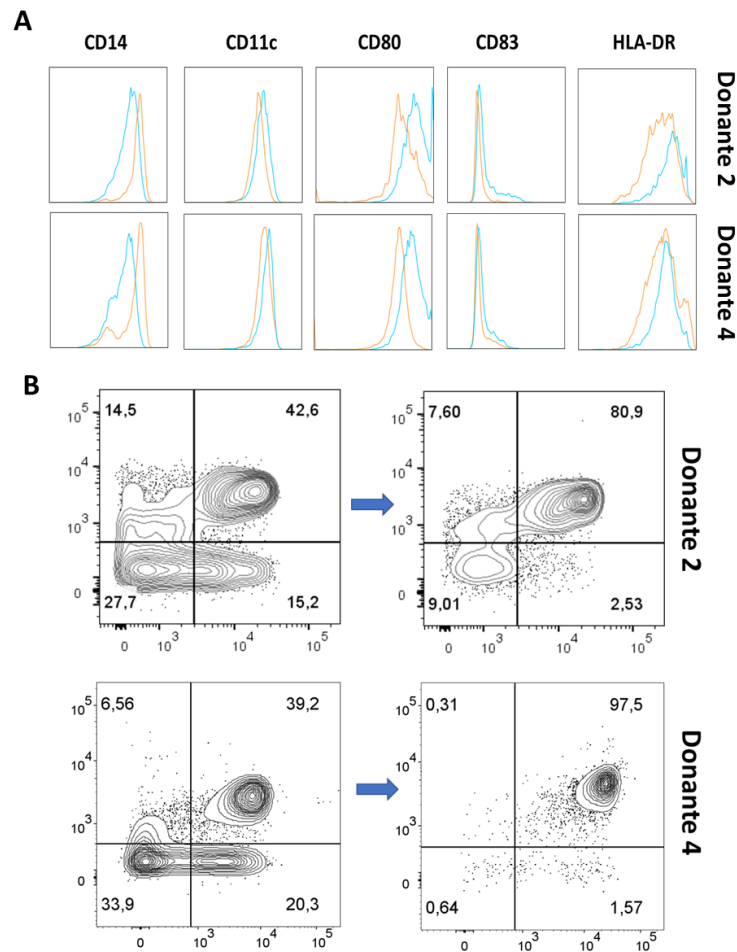
esperaría obtener una mayor respuesta gracias al “*priming*” *in-vitro* entre las DCs y las células vírgenes desde el inicio del cocultivo.

Debido a que uno de los propósitos iniciales era simplificar el sistema de cultivo para la detección de LT neoantígeno específicos, se obtuvieron DCs *in-situ* mediante el protocolo anteriormente mencionado, con algunas modificaciones. Una vez las células eran maduradas y pulsadas con el pool de A2 o el pool de neoantígenos, las células no adherentes eran retiradas del plato con el fin de conservar las DCs *in-situ* en el plato de cultivo. Una fracción de las DCs fueron recolectadas y evaluadas por citometría de flujo para los marcadores de maduración CD80, CD83 y HLA-DR, con el fin de comprobar que las células generadas *in-situ* exhibiesen el fenotipo de DCs maduras comparado con la población monocitoide de las PBMCs totales. Durante estos procesos de recolección y de evaluación por citometría de flujo se pudo evidenciar que, a pesar de realizar lavado para descartar la fracción no adherente, las células dendríticas parecían estar formando clústeres con otras células más pequeñas y circulares, lo cual fue confirmado por los análisis de citometría de flujo (Figura S7).

Paralelamente a la obtención de DCs, se realizó el enriquecimiento de LT CD8+ vírgenes por separación magnética. Las células fueron evaluadas antes y después del enriquecimiento por citometría de flujo con los marcadores de memoria CD45RA y CCR7, con el fin de comprobar la separación y el grado de pureza de las células obtenidas (Figura S8). Una vez se realizó el cocultivo de las DCs *in-situ* con los LT CD8+ vírgenes, se adicionó IL-21 en las primeras 72h y luego se hizo recambio de medio suplementado con IL-7 e IL-15 los días 3, 5 y 7. En el día 9 las células fueron recolectadas y divididas en dos fracciones, una fracción fue sembrada en un plato de ELISPOT para cuantificar células IFN- $\gamma$ +, la otra fracción sometida a una segunda ronda de estimulación durante 10 días adicionales. En el día 20 las células fueron reestimuladas para evaluar las citoquinas intracelulares y en aquellas células respondedoras a los pools se realizó la marcación por tetrámero.

Este sistema de cultivo fue usado en el donante 2 y el 4, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el sistema de cultivo 2. La expresión

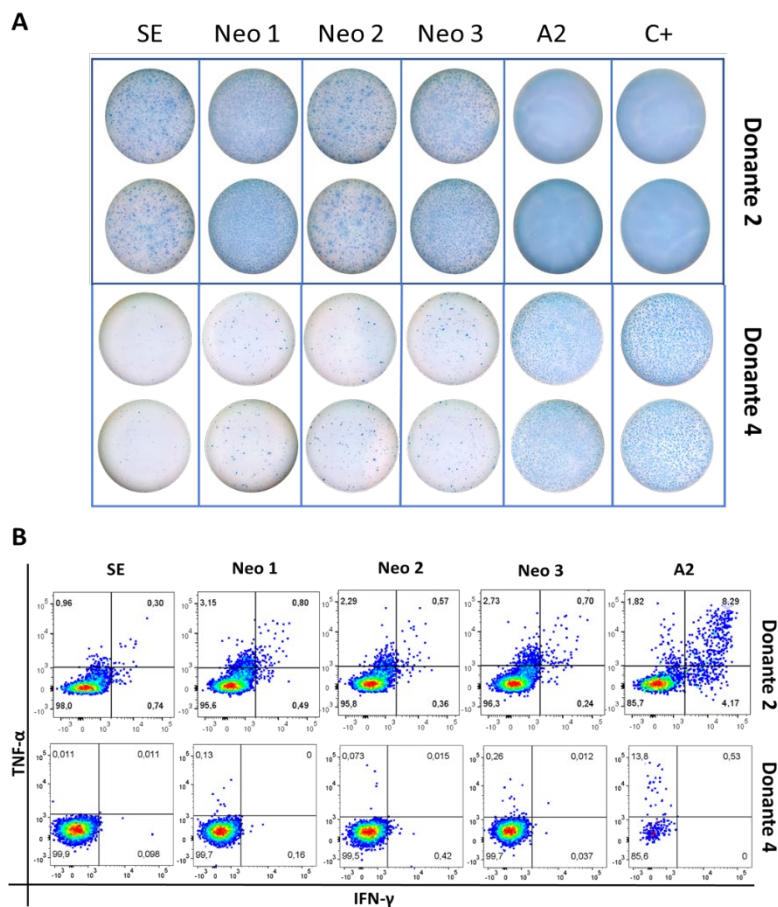
diferencial de los marcadores de maduración CD80, CD83 y HLA-DR para las DCs *in-situ* comparada las PBMCs totales, refleja la obtención de DCs maduras (Figura 19A). Adicionalmente, el porcentaje de enriquecimiento de los LT CD8 vírgenes fue diferente para cada uno de los donantes (Donante 2: 80.9%; Donante 4: 97.5%) (Figura 19B).



**Figura 19. Obtención de DCs *in-situ* y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales.** (A) PBMCs de los donantes sanos fueron cultivadas en presencia de IL-4 y GM-CSF por 24h, posteriormente se estimularon con LPS e IFN- $\gamma$  y se pulsaron con los péptidos por 24h adicionales para la obtención de DCs *in-situ*. Se evaluaron por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD14, CD11c, CD80, CD83 y HLA-DR en las DCs *in-situ* obtenidas por el coctel de citoquinas (Histograma naranja) y las PBMCs totales (Histograma azul). (B) Enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales. La pureza del enriquecimiento de la fracción virgen se midió antes y después de la separación magnética por selección negativa para cada uno de los donantes.

La primera ronda de estimulación fue evaluada mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$ , encontrando nuevamente en ambos donantes una respuesta predominante al pool

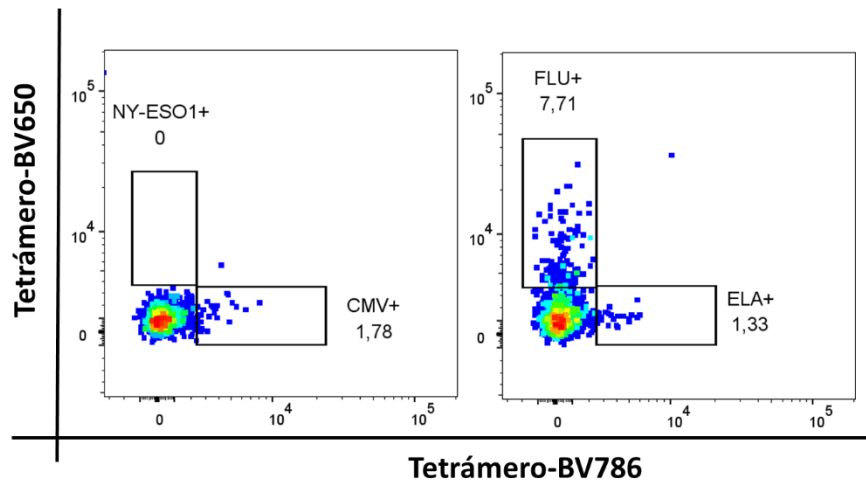
de A2 comparado con las células sin estimular (Figura 20A). La respuesta después de la segunda ronda fue evaluada por citoquinas intracelulares IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , evidenciando para el donante 2 resultados parecidos a los obtenidos en el ELISPOT, pues para el pool de A2 hay un porcentaje de LT CD8+ secretoras de citoquinas (CD8+IFN- $\gamma$ + o CD8+IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ +) mayor que en las células sin estimular, mientras que para los neoantígenos hay una respuesta mucho más discreta (Figura 20B). Este patrón de respuesta no se observó en el donante 4, pues ante el segundo reestímulo con el pool de A2 muy pocas células pudieron ser analizadas debido a una baja viabilidad, mientras que para los neoantígenos la respuesta fue casi nula (Figura 20B y Figura S9).



**Figura 20. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con DCs in-situ después de una y dos rondas de estimulación con los pools de antígenos. (A)** Las células provenientes del cocultivo después de la primera ronda de estimulación con los pools de antígenos fueron reestimuladas y evaluadas por ELISPOT ante la presentación de cada uno de los pools de péptidos en PBMCs autólogas irradiadas. **B)** La reactividad de las células a una segunda ronda de estimulación fue evaluada mediante la producción de citoquinas intracelulares

IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al ser reestimadas con cada uno de los pools de péptidos. SE: PBMCs autólogas irradiadas sin ningún péptido. C+: Coctel de activación de PMA e Ionomicina.

En vista de los resultados de las ICS, se realizó marcación con doble tetrámero para las células provenientes del pool de A2 en el donante 2, pudiendo determinar que la respuesta provenía principalmente de LT CD8+ específicas para FLU (7.71%), seguido de CMV (1.78%) y por último Melan-A (1.33%) (Figura 21). Desafortunadamente, al final de cultivo no se obtuvieron suficientes células para realizar el tetrámero en las células estimuladas con los diferentes pools de neoantígenos.



**Figura 21. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 en el donante 2.** Los LT CD8 estimuladas dos rondas con el pool de A2 del donante fueron marcados con tetrámeros para las cuatro epitopes del pool (ELA, CMV, NY-ESO, FLU).

#### 7.1.5 Cuarto sistema de cultivo: Cocultivo de moDCs con LT CD8 vírgenes permite la detección de LT neoantígeno específicos.

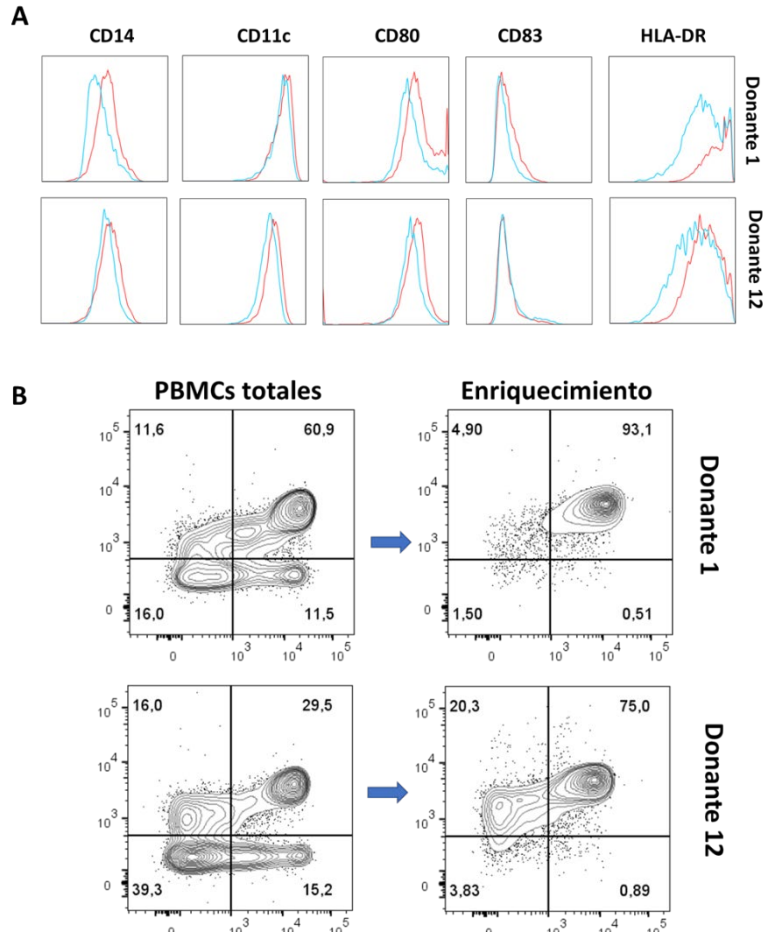
El tercer sistema de cultivo permitió en el donante 2 expandir y detectar LT antígeno específico para Flu (Figura 21), población que previamente no se había observado (Figura 13A). Sin embargo, en el donante 4 solo fue posible evidenciar una respuesta en la primera ronda de estimulación con el pool de A2, pues la viabilidad de las células era baja después de un segundo ciclo. Esto puede ser atribuido al fenómeno observado al momento de realizar las DCs *in-situ*, donde después de los



lavados para retirar las células no adherentes, se observaron clústeres de células de DCs junto a células más pequeñas, que posiblemente se tratasen de linfocitos que ya estuvieran haciendo *priming* debido a la exposición de los péptidos dentro del coctel de maduración de las DCs, y que ante los reestímulos y la presencia de IL-2 hacen que la viabilidad de estos linfocitos se vea comprometida por sobreestimulación.

Por esta razón, se planteó un cuarto sistema de cultivo en el cual se pasó de un protocolo de DCs *in-situ* en 48h a DCs derivadas en 4 días a partir de monocitos purificados (moDCs). Para la obtención de moDCs se realizó la adherencia de monocitos, posteriormente la derivación a DCs con IL-4 y GM-CSF y por último la maduración de estos con LPS e IFN- $\gamma$ . Una fracción de las DCs fue recolectada y evaluadas por citometría de flujo para los marcadores de maduración CD80, CD83 y HLA-DR. Una vez se obtuvieron las DCs, se realizó el enriquecimiento de los LT CD8 vírgenes como se mencionó anteriormente, para ser cocultivados bajo las mismas condiciones utilizadas en el tercer sistema de cultivo.

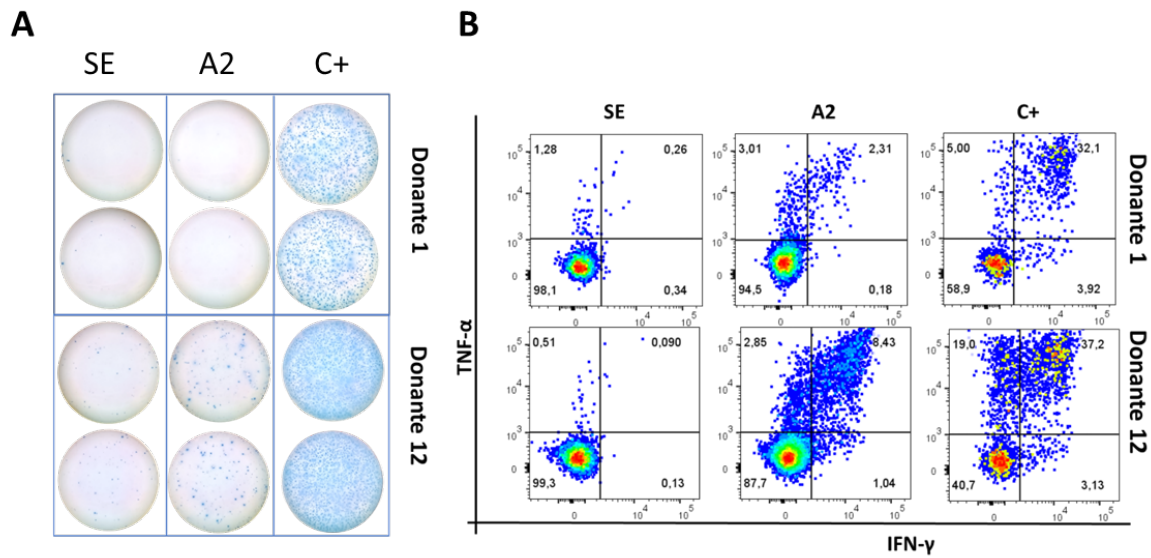
Este nuevo sistema de cultivo se realizó en dos nuevos individuos diferentes a los anteriores debido a la baja cantidad de células disponibles de los donantes 2 y 4, sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el pool A2 en los dos primeros sistemas de cultivo, se seleccionaron los donantes 1 y 12 para estos ensayos. La expresión de los marcadores CD80, CD83 y HLA-DR refleja la obtención de DCs maduras (Figura 22A). Por otra parte, el porcentaje de enriquecimiento de los LT CD8+ vírgenes es diferente para cada uno de los donantes (Donante 1: 93.1%; Donante 12: 75%) (Figura 22B).



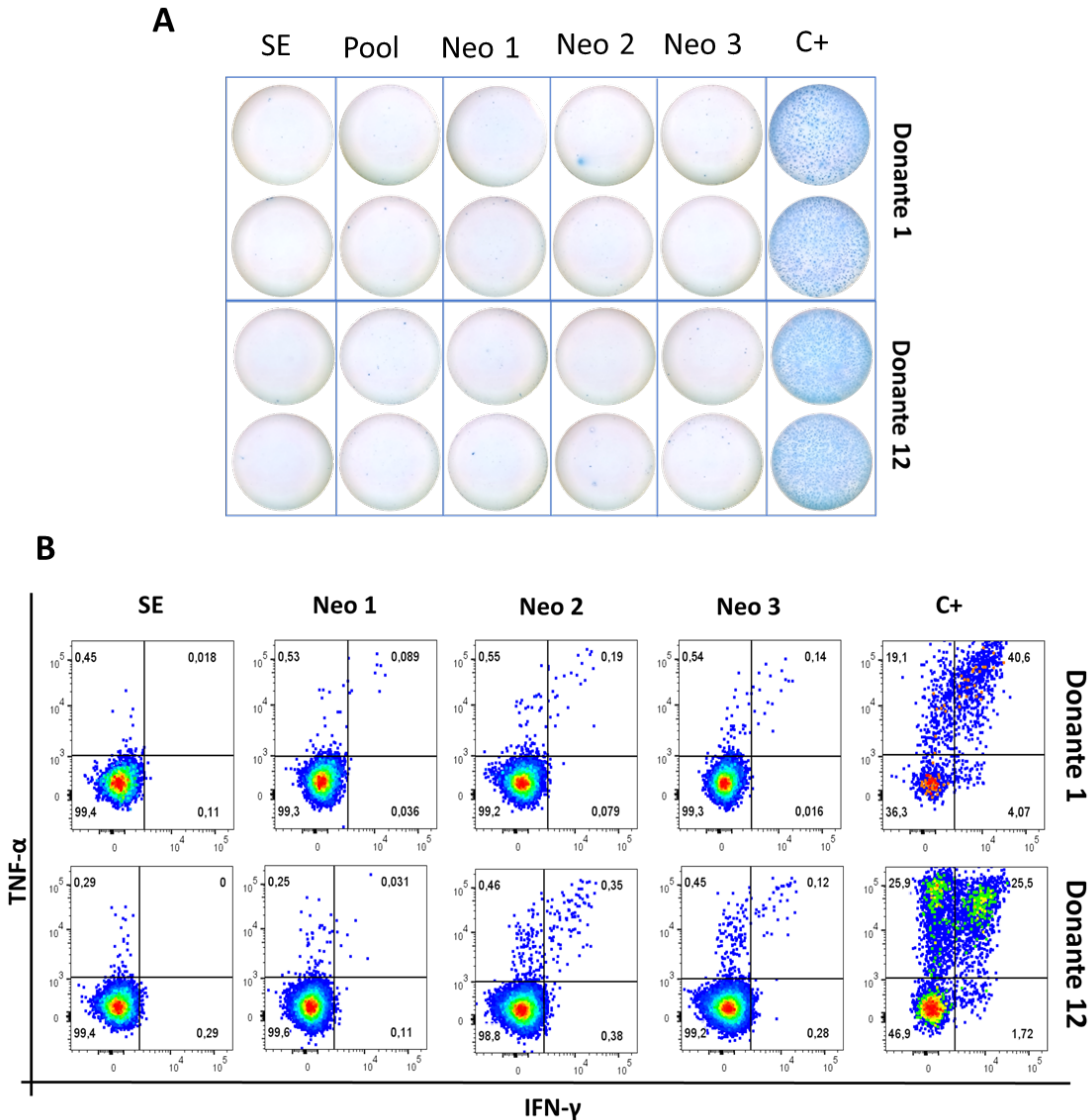
**Figura 22. Obtención de DCs derivados de monocitos y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales en los donantes 1 y 12.** (A) Monocitos adherentes fueron cultivados durante 72 horas en presencia de IL-4 y GM-CSF, luego se adicionó el coctel de maduración con IFN- $\gamma$  y LPS durante 24 horas. Se evaluaron por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD14, CD11c, CD80, CD83 y HLA-DR en las DCs inmaduras (Histograma azul) y en las DCs maduras (Histograma rojo). (B) Enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales. La pureza del enriquecimiento de la fracción virgen se midió antes y después de la separación magnética por selección negativa para cada uno de los donantes.

La evaluación del primer estímulo se realizó mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$ , dando como resultado una discreta respuesta únicamente al pool de A2 en el donante 12 (Figura 23A y 24A). Para la segunda ronda de estimulación, la respuesta fue evaluada mediante ICS dando como resultado un alto porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> secretoras de citoquinas para el pool A2 comparado con las células sin estimular, siendo este porcentaje mayor en el donante 12 (D1: 2.31%; D12: 8.43%) (Figura 23B). En cuanto al pool de neoantígenos, se observó un menor porcentaje de LT

CD8+ secretoras de citoquinas para el pool Neo 2 y Neo 3 en ambos donantes, aunque mayor al obtenido en el control negativo (Figura 24B).



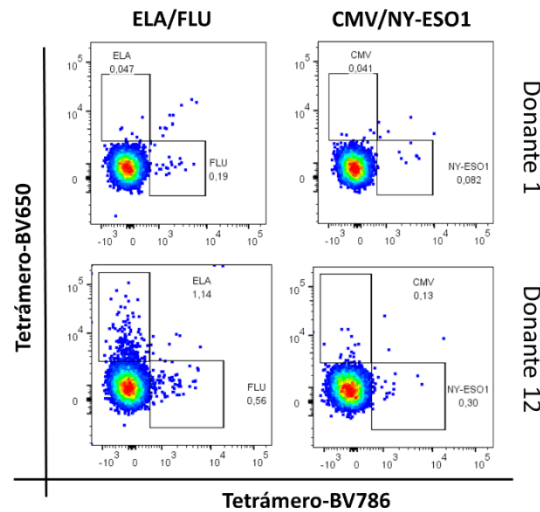
**Figura 23. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con moDCs después de una y dos rondas de estimulación con el pool de A2.** (A) Las células provenientes del cocultivo después de la primera ronda de estimulación con el pool de A2 fueron reestimuladas y evaluadas por ELISPOT ante la presentación de cada uno de los pools de péptidos en PBMCs autólogas irradiadas. B) La reactividad de las células a una segunda ronda de estimulación fue evaluada mediante la producción de citoquinas intracelulares IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al ser reestimuladas con el pool de A2. SE: PBMCs autólogas irradiadas sin ningún péptido. C+: Coctel de activación de PMA e Ionomicina.



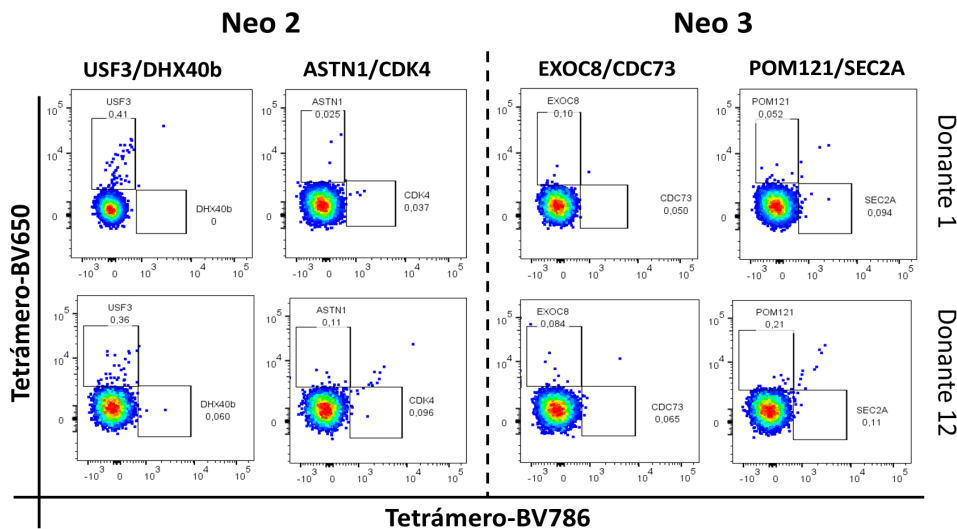
**Figura 24. Evaluación de la reactividad de los LT CD8 vírgenes provenientes del cocultivo con moDCs después de una y dos rondas de estimulación con el pool de neoantígenos.** (A) Las células provenientes del cocultivo después de la primera ronda de estimulación con el pool de neoantígenos fueron reestimuladas y evaluadas por ELISPOT ante la presentación de cada uno de los pools de péptidos en PBMCs autólogas irradiadas. B) La reactividad de las células a una segunda ronda de estimulación fue evaluada mediante la producción de citoquinas intracelulares IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al ser reestimuladas con cada uno de los pools de neoantígenos. SE: PBMCs autólogas irradiadas sin ningún péptido. C+: Coctel de activación de PMA e Ionomicina.

Aquellas células que tenían una respuesta por ICS fueron marcadas con tetrámero para identificar la población respondedora a cada uno de los pools, por tal razón en ambos donantes se evaluaron las células del pool A2, Neo 2 y Neo 3. Para el

caso del pool A2, se pudo detectar en el donante 12 células específicas para ELA (1.14%) y FLU (0.56%), mientras que en el donante 1 no hubo una marcación clara para ninguno de los péptidos del pool A2 (Figura 25). En el escenario de los pools de neoantígenos se evidenció en ambos donantes únicamente la presencia de LT CD8 específicos para el neoantígeno USF3 del pool Neo 2 (D1: 0.41%; D12: 0.36%) (Figura 26). Estos resultados demuestran el potencial que tiene este cuarto sistema de cultivo para la expansión y detección de LT neoantígeno específicos.



**Figura 25. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool de A2 en el donante 2.** Los LT CD8 estimuladas dos rondas con el pool de A2 de los donantes 1 y 12 fueron marcados con tetrámeros para las cuatro epítopes del pool (ELA, CMV, NY-ESO, FLU).



**Figura 26]. Detección de LT CD8+ específicos a los neoantígeno del pool Neo 2 y Neo 3 en los donantes 1 y 12.** Los LT CD8 estimulados por dos rondas con el pool de neoantígenos de los donantes 1 y 12 fueron marcados con tetrámeros para las cuatro epítopes del pool Neo 2 (USF3, DHX40b, ASTN1, CDK4) y las cuatro epítopes del pool Neo 3 (EXOC8, CDC73, POM121, SEC2A)

### 7.1.6 Comparación entre los diferentes sistemas de cultivo

Se compararon los resultados obtenidos para ELISPOT, ICS y tetrámero en los casos en los que fue evaluado para los distintos sistemas de cultivo. Para el caso de ELISPOT, reportados por spots/ $2 \times 10^5$  células y *Fold Change*, se observa una respuesta constante al pool A2 en todos los tipos de cultivos, mientras que para los pools de neoantígenos parece que el único caso donde parece hubo una respuesta fue en el donante 4 en el tercer sistema de cultivo (Tabla 3).

**Tabla 3. Comparación de la cuantificación de los resultados del ELISPOT según el tipo de cultivo.** (A) Spots/ $2 \times 10^5$  células y (B) Fold change con respecto a los spots en las células sin estimular. Sistema 2 en verde, sistema 3 en amarillo y sistema 4 en azul.

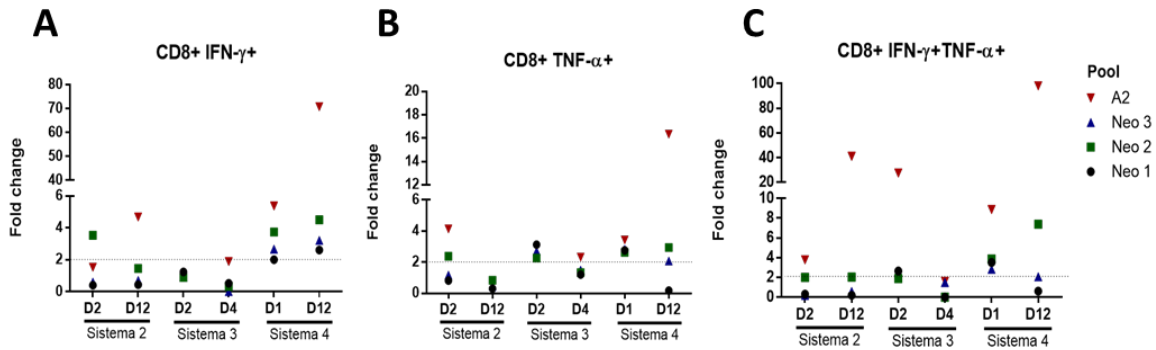
**A**

Spots/ $2 \times 10^5$	SE	A2	Neo 1	Neo 2	Neo 3
D2	661,5	995	237	0	7
D12	286	444	0	0	0
D2	661,5	1339	23,5	0	271,5
D4	16,5	1029,5	37	93,5	76
D1	3,5	0	3	0	0
D12	2,5	78,5	1,5	0,5	7

**B**

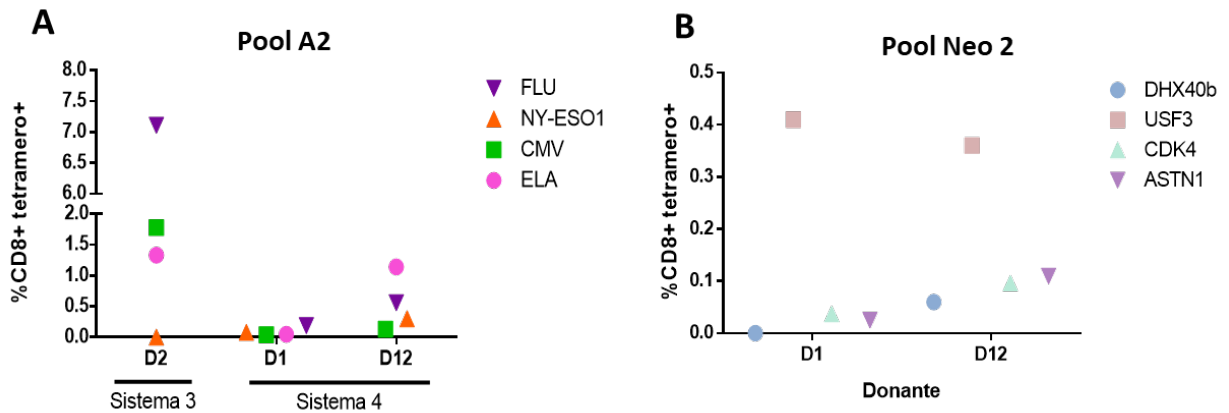
Foldchange	A2	Neo 1	Neo 2	Neo 3
D2	3,02	1,04	0,94	1,41
D12	2,55	0,02	0,05	0,73
D2	3,02	1,04	0,94	1,41
D4	121,21	3,24	6,67	5,61
D1	0,00	1,86	1,71	1,71
D12	3,12	1,60	1,80	4,60

En el caso de las citoquinas intracelulares se observa un fenómeno diferente, pues se ve un aumento de la respuesta tanto para el pool A2 como los pools de neoantígenos, lo cual puede estar relacionado con la segunda ronda de estimulación. Para el pool A2 la respuesta es constante en los 3 tipos de cultivo, incluso detectando LT polifuncionales por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al mismo tiempo. En cuanto a los pools de neoantígenos, se evidenció la respuesta en el sistema de cultivo 4 (Figura 27 y tabla S4).



**Figura 27.** Comparación en el *fold change* del % LT CD8 productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  intracelular según el sistema de cultivo. (A) % LT CD8+ IFN- $\gamma$ +, (B) % LT CD8+ TNF- $\alpha$ + y (C) %LT CD8+IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ +

Por último, la evaluación por tetrámero para el Pool A2 se realizó en tres donantes diferentes encontrando una especificidad distinta para cada uno de ellos. Para el donante 2 predomina la respuesta a Flu, para el donante 12 la respuesta a Melan-A para el donante 1 no se evidenció ninguna especificidad para los péptidos del pool de A2 (Figura 28A). En el caso de los neoantígenos, solamente se logró detectar LT CD8+ específico contra el neoantígeno USF3 proveniente del pool Neo 2 en el sistema de cultivo 4 (Figura 28B).



**Figura 28.** Comparación del % LT CD8 tetrámero específicos para los péptidos del pool de A2 y el pool Neo 2 según el sistema de cultivo. (A) %CD8+tetramero+ para pool A2 y (B) %CD8+tetramero+ para pool Neo 2.

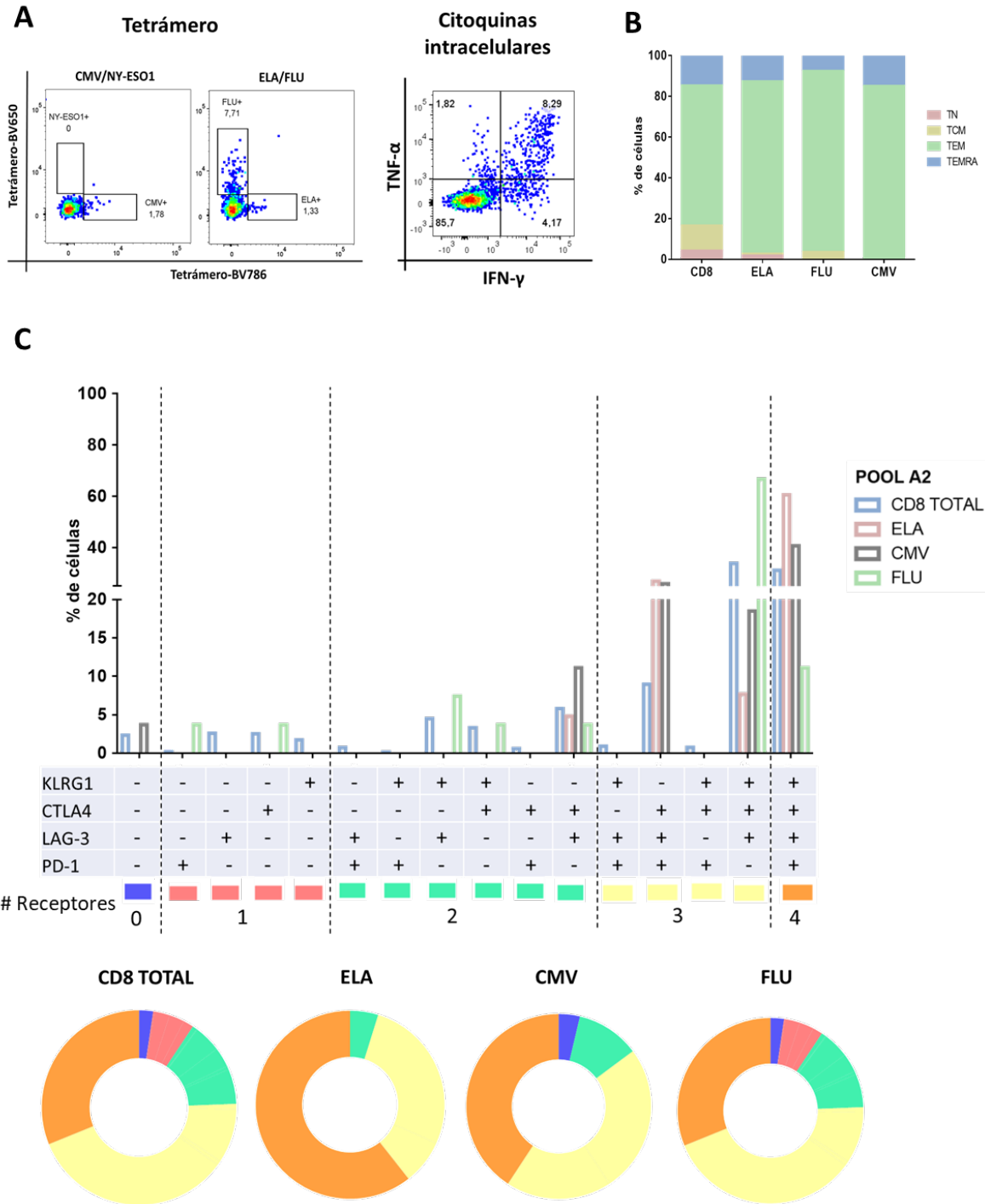
## 7.2 Segundo objetivo

### 7.2.1 Las células neoantígeno específicas mantienen el fenotipo virgen y una baja co-expresión de marcadores de agotamiento.

El fenotipo de memoria y la expresión de los correceptores inhibitorios PD-1, LAG-3, CTLA-4 y senescencia KLRG1 fueron evaluados por citometría de flujo en los LT CD8 totales y los antígeno específicos detectados por tetrámero en los donantes 1, 2 y 12. En el donante 2 se logró detectar LT CD8 antígeno específicos para el pool A2 tanto por tetrámero como por citoquinas intracelulares mediante el sistema de cultivo 3 (Figura 29A). En este caso se pudo observar que tanto los LT CD8+ totales como los LT CD8+ tetrámero específicos para FLU, ELA y CMV tuvieron un fenotipo de memoria predominante de células efectoras de memoria (TEM) y células efectoras terminalmente diferenciadas (TEMRA) (Figura 29B).

En cuanto a los marcadores de agotamiento y senescencia para este mismo donante, se puede observar que la mayoría de las células CD8 totales y tetrámero específicas están co-expresando 3 a 4 de los marcadores (Figura 29C), primando las poblaciones CD8+KLRG1+CTLA-4+LAG-3+, CD8+CTLA-4+LAG-3+PD-1+ y CD8+KLRG1+CTLA-4+LAG-3+PD-1+. Al detallar estos mismos correceptores en las poblaciones de memoria, se observó que las células TEM y TEMRA son las que co-expresan estos marcadores (Figura S11). Estas dos características sugieren que las células están muy diferenciadas y agotadas, lo cual podría explicarse por la presencia de LT de memoria al inicio del cultivo dado por el 80.9% de pureza del enriquecimiento de LT CD8+ vírgenes como por lo observado con el protocolo de obtención de DCs *in-situ* mencionado anteriormente.

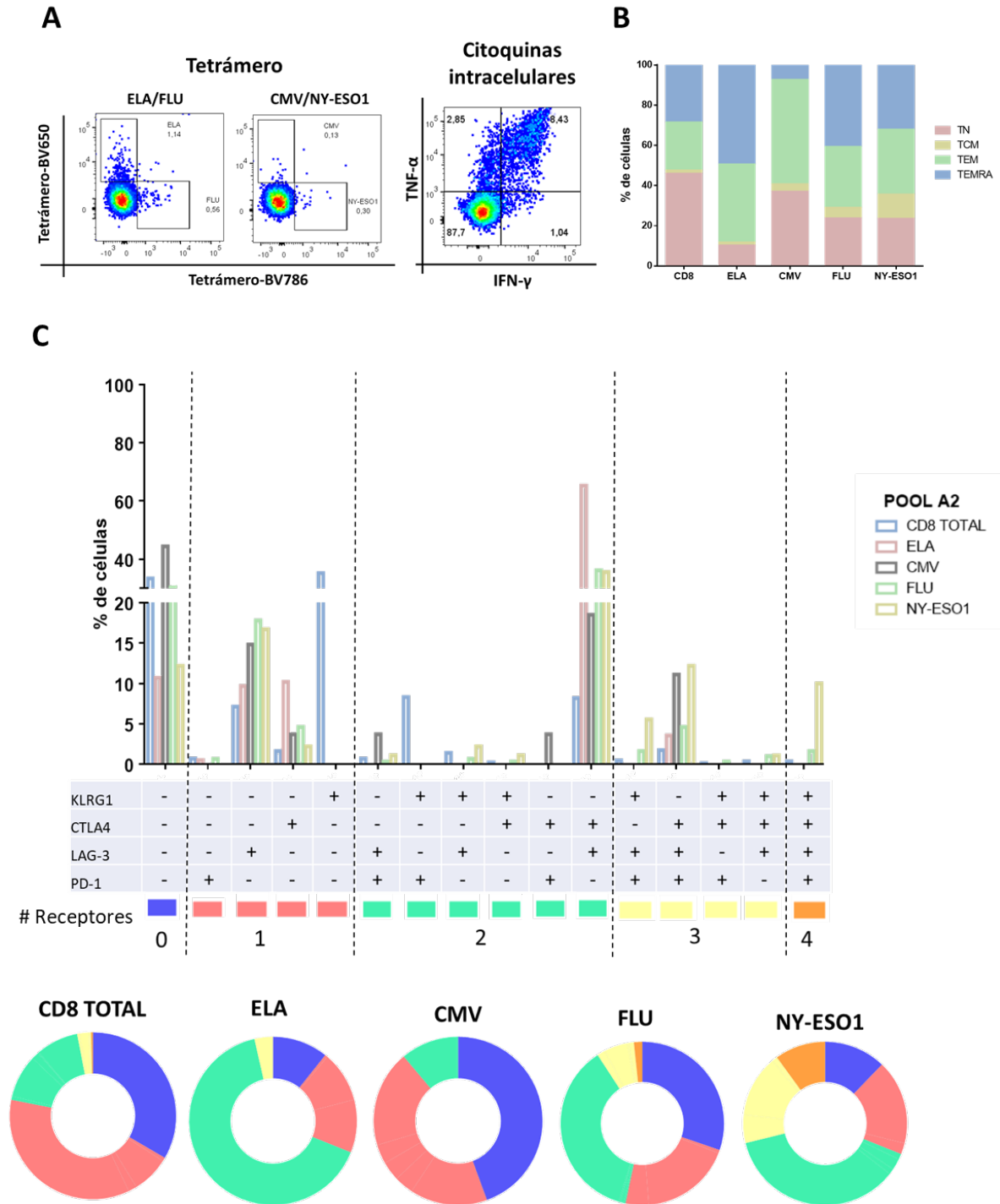




**Figura 29. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 2 mediante el tercer sistema de cultivo. (A) Resultados del tetrámero y citoquinas intracelulares para el pool de A2. (B) Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Vírgenes (TN:CD45RA+CCR7+); Memoria Central (TCM, CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (TEM, CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (TEMRA, CD45RA+CCR7-) medido por citometría de flujo en las CD8 totales y en las CD8 tetrámero específicas para cada antígeno del pool. (C) Perfil de expresión de**

marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) establecido por medio de análisis booleanos de los gates positivos para cada uno de los marcadores medidos mediante FlowJo. La gráfica de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8+ totales como los LT CD8+ antígeno específicos. Los gráficos de torta demuestran la contribución relativa de cada combinación posible que contribuye al estado de agotamiento y senescencia, con cada color representando el número de marcadores producidos simultáneamente en los LT CD8 totales o LT CD8 antígeno específicos.

En el donante 12 se logró detectar LT CD8 antígeno específicos para el pool A2 tanto por tetrámero como por citoquinas intracelulares mediante el sistema de cultivo 4 (Figura 30A). Los análisis del fenotipo de memoria evidenciaron que los LT CD8+ totales tienen un fenotipo de memoria menos diferenciado, ya que alrededor del 50% de las células mantenían el fenotipo virgen, seguido de memoria efectora y terminalmente diferenciadas. Por el contrario, las células tetrámero-positivas tenían un fenotipo predominante TEM y TEMRA, pero manteniendo un porcentaje de células vírgenes según el antígeno (Figura 30 A y B). En cuanto a los marcadores de agotamiento y senescencia, los LT CD8+ totales expresan máximo un correceptor, predominando KLRG1. Por el contrario, las células específicas para cada uno de los antígenos del pool A2 en su mayoría expresan LAG-3 y/o CTLA-4 (Figura 30C). Al analizar cada uno de estos marcadores en las poblaciones de memoria se observó que las células más diferenciadas son aquellas que tienen una mayor co-expresión de dos marcadores entre LAG-3, CTLA-4 y PD-1 (Figura S12).

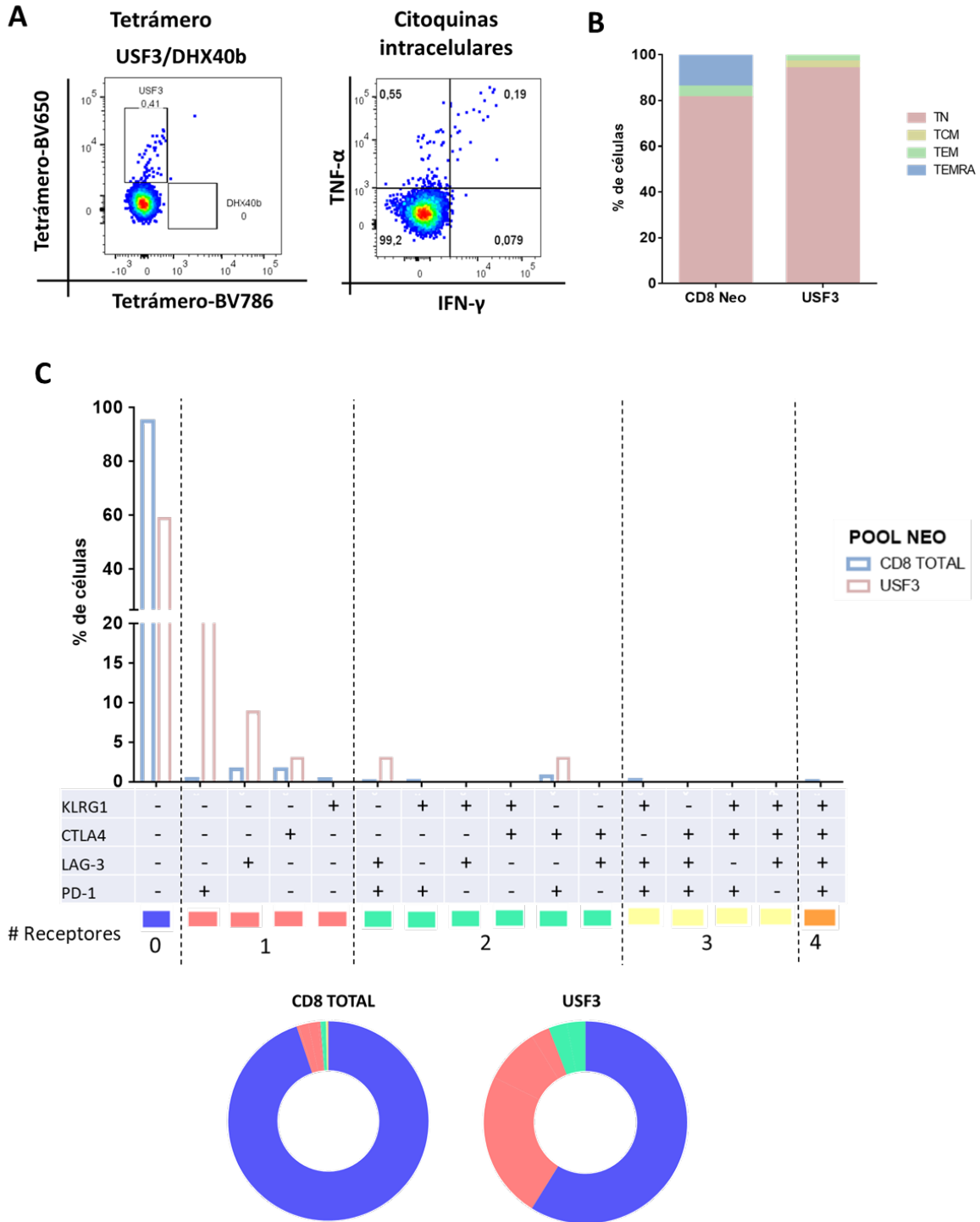


**Figura 30. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo. (A) Resultados del tetrámero y citoquinas intracelulares para el pool de A2. (B) Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Vírgenes (TN:CD45RA+CCR7+); Memoria Central (TCM, CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (TEM, CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (TEMRA, CD45RA+CCR7-) medido por citometría de flujo en las CD8 totales y en las CD8 tetrámero específicas para cada antígeno del pool. (C) Perfil**

de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) por medio de análisis boléanos de los gates pósitos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. Las gráficas de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 antígeno específicos. Los gráficos de torta demuestran la contribución relativa de cada combinación posible que contribuye al estado de agotamiento y senescencia, con cada color representando el número de marcadores producidos simultáneamente en los LT CD8 totales o LT CD8 antígeno específicos.

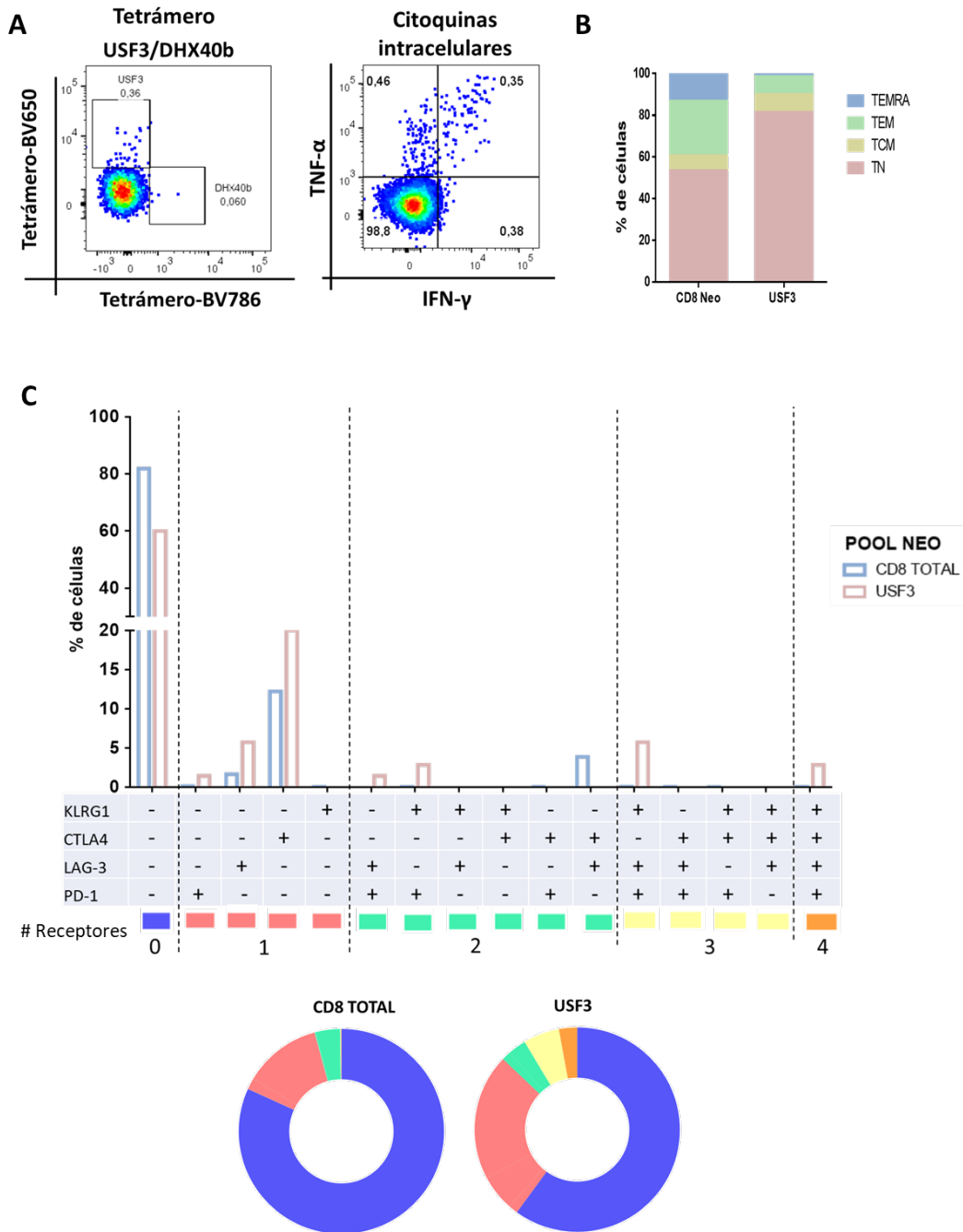
En los donantes 1 y 12 se logró detectar LT CD8 antígeno específicos para el neoantígeno USF3 del pool A2 tanto por tetrámero como por citoquinas intracelulares mediante el cuarto sistema de cultivo (Figura 31A y 32B). Los LT CD8+ totales y específicos para USF3 de estos dos donantes fueron caracterizados para su fenotipo de memoria y marcadores de expresión, encontrando que en ambos casos predomina tanto en los LT CD8 totales como en los neoantígeno específicos el fenotipo virgen (Figura 31B y 32 B). En el donante 12 se evidencia un mayor porcentaje de TCM y TEM comparado con el donante 1, lo cual podría explicarse por el rendimiento del enriquecimiento de las células vírgenes (D12: 75%; D1: 93.1%).

De igual manera, al evaluar los marcadores de agotamiento se puede observar que las células CD8 totales en su mayoría no están expresando ninguno de los receptores, mientras que las células específicas para USF3 del donante 1 y 12 expresan máximo un marcador, PD-1 o CTLA-1 respectivamente (Figura 31C y 32). Al analizar estos marcadores de agotamiento en las diferentes poblaciones de memoria, se puede observar que tanto los LT CD8 totales como los específicos para USF3 que las células vírgenes y las células de memoria expresan máximo uno de los correceptores inhibitorios (LAG-3 o CTLA-4) (Figura S11). En el caso del donante 12 existe un 15% de las células de memoria central tetrámero específicas que expresan los cuatro receptores (Figura S12).



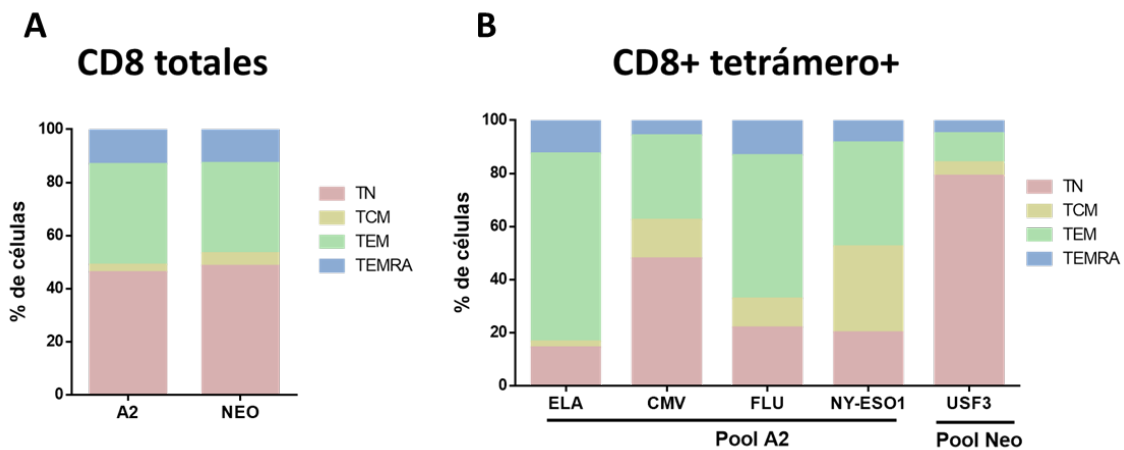
**Figura 31. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 1 mediante el cuarto sistema de cultivo. (A) Resultados del tetrámero y citoquinas intracelulares para el pool Neo 2. (B) Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Vírgenes (TN:CD45RA+CCR7+); Memoria Central (TCM, CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (TEM, CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (TEMRA, CD45RA+CCR7-) medido por citometría**

de flujo en las CD8 totales y en las CD8 tetrámero específicas para USF3. (C) Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) por medio de análisis boléanos de los gates póstos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. La gráfica de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 específicos para USF3. Los gráficos de torta demuestran la contribución relativa de cada combinación posible que contribuye al estado de agotamiento y senescencia, con cada color representando el número de marcadores producidos simultáneamente en los LT CD8 totales o LT CD8 neoantígeno específicos.



**Figura 32. Caracterización del fenotipo de memoria y la co-expresión de marcadores de agotamiento y senescencia para los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.** (A) Resultados del tetrámero y citoquinas intracelulares para el pool Neo 2. (B) Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Vírgenes (TN:CD45RA+CCR7+); Memoria Central (TCM, CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (TEM, CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (TEMRA, CD45RA+CCR7-) medido por citometría de flujo en las CD8 totales y en las CD8 tetrámero específicas para USF3. (C) Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) por medio de análisis boléanos de los gates póstos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. La gráfica de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 específicos para USF3. Los gráficos de torta demuestran la contribución relativa de cada combinación posible que contribuye al estado de agotamiento y senescencia, con cada color representando el número de marcadores producidos simultáneamente en los LT CD8 totales o LT CD8 neoantígeno específicos.

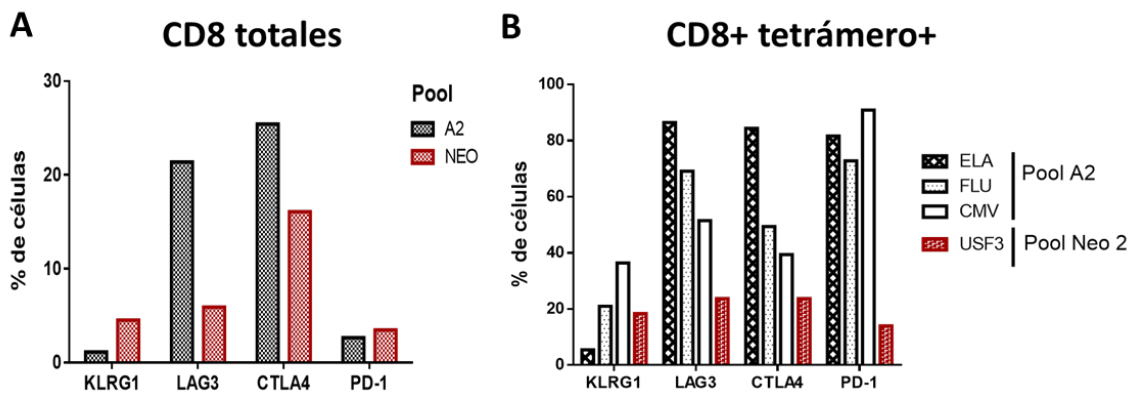
Por último, se comparó en el donante 12 las células estimuladas con el pool A2 vs las del pool de neoantígenos tanto a nivel de LT CD8+ totales como de los LT tetrámero-específicos. Como resultados se obtuvo que a nivel de los LT CD8 totales se observa un patrón muy similar del fenotipo de memoria tanto para el pool A2 como el de neoantígenos, alrededor del 45% son células vírgenes seguido de un 40% de TEM (Figura 33A). Sin embargo, cuando se detalla a nivel de las células tetrámero específicas si se puede evidenciar una diferencia importante, pues aquellas específicas para los péptidos del pool de A2 en su mayoría fueron células efectoras de memoria, mientras que los CD8+ específicos para USF3 exhibieron un fenotipo menos diferenciado y predominante de células vírgenes (Figura 33B).



**Figura 33. Comparación del fenotipo de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 vs el pool de neoantígenos en el donante 12 obtenidos mediante el cuarto sistema de cultivo.** Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Vírgenes (TN:CD45RA+CCR7+); Memoria Central (TCM, CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (TEM, CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (TEMRA, CD45RA+CCR7-)

(TEMRA, CD45RA+CCR7-) medido por citometría de flujo en las CD8 totales (A) y en las CD8 tetrámero específicas (B).

En cuanto a los marcadores de agotamiento y senescencia se puede observar un patrón de expresión diferente a nivel de los LT CD8 totales, pues en las células estimuladas con el pool de A2 hubo un mayor porcentaje de células que expresan LAG3 y CTLA4 comparado con aquellas que fueron estimuladas con el pool de neoantígenos (Figura 34A), lo cual fue similar a lo detectado con las células tetrámero-específicas tanto para el pool de A2 como para los neoantígenos (Figura 34B).



**Figura 34. Comparación en la expresión total de marcadores de agotamiento y senescencia de los linfocitos estimulados con el pool A2 vs el pool de neoantígenos en el donante 12 obtenidos mediante el cuarto sistema de cultivo.** Porcentaje de células CD8 positivas para los marcadores PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1 medido por citometría de flujo en las CD8+ totales (A) y en las CD8+ tetrámero específicas (B).

### 7.3. Tercer objetivo

Dadas las dificultades en la evaluación *in-vitro* de los neoantígenos en las pacientes con cáncer se planteó el uso de los donantes sanos para detectar LT CD8+ específicos para neoantígenos públicos o privados, no obstante, los resultados de los objetivos 1 y 2 permitieron evidenciar la detección de LT CD8+ específicos para neoantígenos inmunogénicos en donantes sanos reviste dificultades y en nuestras manos este empeño reveló por una amplia variabilidad de los resultados dependiendo del neoantígeno y del donante. Por tal razón, se exploró una metodología alternativa que quizás permita mejorar la selección de los



neoantígenos con potencial inmunogénico. En el presente trabajo se plantea el uso de las herramientas *in-silico* como el docking molecular y la dinámica molecular para dilucidar interacciones moleculares del complejo péptido-HLA determinantes de la inmunogenicidad para los LT CD8+ de estos complejos. Estas herramientas computacionales permiten develar los mecanismos de interacción entre moléculas a nivel atómico y ya han mostrado su utilidad en el diseño racional de fármacos y en general para la comprensión de interacciones no covalentes de tipo receptor-ligando [21]. La interacción de HLA-péptido-TCR es un blanco ideal para este tipo de herramientas, no obstante, poco se ha explotado en la identificación de neoantígenos inmunogénicos. Para ello, basándonos en el estudio de Strønen y colaboradores, se seleccionaron neoantígenos que fueron predichos y evaluados *in-vitro* y de los cuales se tienen información de inmunogenicidad (tanto casos positivos como negativos), con el fin de analizarlos a través de las técnicas de modelaje molecular previamente mencionadas.

### 7.3.1 Falencias en las herramientas de predicción

El neoantígeno del gen AKAP6 se genera por una mutación en la posición 6 (P6) de la secuencia peptídica al sustituir un ácido glutámico por una lisina (E/K), lo cual genera un cambio significativo pues pasa de un aminoácido con carga negativa a uno con carga positiva. Según el análisis por las herramientas de predicción, tanto la versión silvestre como la mutante revelan que estas secuencias exhiben características de secuencias inmunogénicas, sin embargo, en la evaluación *in-vitro* realizada por Strønen *et al.* este neoantígeno no induce en LT CD8+ las respuestas inmunes evaluadas (detección de LT CD8+ específicos a neoantígenos mediante multímeros y posterior reactividad medida por expresión de CD107 A/B e IFN- $\gamma$  de los clones tetrámero-positivos contra células tumorales *in-vitro*). En contraste, el neoantígeno del gen ASTN 1, originado por una mutación en la posición 2 (P2) que genera el cambio de una prolina por una leucina (P/L), reemplazo conservado de un aminoácido neutro (no polar) por otro con la misma característica. Los resultados de la evaluación *in-vitro* evidenció una expansión de LT CD8+ detectada mediante multímeros y activación evidenciada por la expresión de CD107 A/B e IFN- $\gamma$ . El análisis por las herramientas de predicción permite observar que el neoantígeno

ASTN1 tiene buenas características de afinidad y tiempo de unión al HLA comparado con la versión silvestre, no obstante, AKAP6 tiene mejores valores que respaldarían estas propiedades. Adicionalmente, para las herramientas NetCTL, que incluyen el análisis del clivaje por el proteasoma y la eficiencia de transporte por TAP, AKAP6, pero no ASTN1, cumple con las características de un epítipo para LT citotóxicos (Tabla 4). Estos resultados son contrarios a lo obtenido por Strønen, ya que en los ensayos *in-vitro* AKAP6 no generó ningún tipo de respuesta mientras que ASNT1 sí. Esto sugiere las falencias que tienen las herramientas *in-silico* para predecir antígenos inmunogénicos y a su vez resaltar la necesidad de explorar otras metodologías que brinden información adicional a los métodos de predicción.

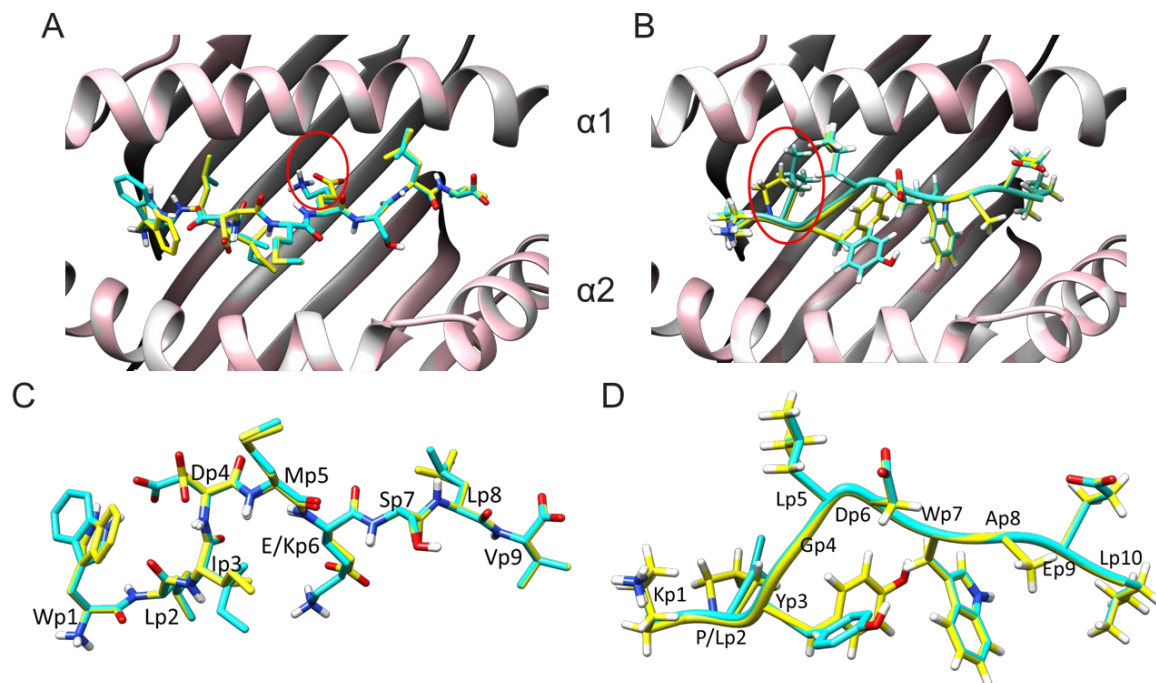
**Tabla 4. Evaluación de las diferentes herramientas tradicionalmente utilizadas para la identificación de neoantígenos.** La respuesta de CD8 fue evaluada mediante multímeros y posterior reactividad medida por expresión de CD107 A/B e IFN- $\gamma$  de los clones tetrámero-positivos contra células tumorales *in-vitro*.

Gen asociado	Mutación	Secuencia peptídica	IN-SILICO					IN-VITRO		
			NetMHC 4.0 (Afinidad: uM)	Ratio Afinidad NEO/WT	NetTepi 1.0 (Epítipo)	NetCTL 1.2 (Epítipo)	NetMHCstab pan 1.0 (Estabilidad: horas)	t1/2 $\beta$ 2 microglobulin (Estabilidad: horas)	Respuesta de LT CD8+ en paciente	Respuesta de LT CD8+ en donante
ASTN1	WT	KPYGLDWAEL	16920	0,003	NO	NO	0.26	-	NO	NO
	P/L	KLYGLDWAEL	43		YES	NO	2.52	8.4	NO	SI
AKAP6	WT	WLIDMESLV	14	1,714	YES	YES	4.14	-	NO	NO
	E/K	WLIDMKSLV	24		YES	YES	4.20	12.3	NO	NO

### 7.3.2 Simulaciones moleculares

Para entender como los cambios de aminoácidos en AKAP6 y ASTN1 generan que un péptido sea inmunogénico y otro no, se determinó la estructura de los péptidos mutantes y silvestres en HLA-A:02:01 por medio de docking molecular. Tanto para AKAP6 como ASTN1, la versión silvestre y el neoantígeno, se unen en una orientación convencional con las cadenas laterales de los residuos P2 y P9/P10 acomodadas en los bolsillos de HLA-A2 (Figura 35 A y B). Para AKAP6: P2 es

Leucina y P9 Valina; para ASTN1: P2 es Prolina/Leucina (WT/Neo) y P10 es Leucina. La Leucina y la Valina están dentro de los residuos más comunes para las posición de anclaje P2 y P9/P10 y son conocidos por conferir una alta afinidad a HLA-A\*02:01 [131]. Las cadenas laterales expuestas para AKPK6 son P1, P5, P8 y para ASTN1 son P1, P5, P6, P8 y P9, todas estas se proyectan lejos de los bolsillos de unión del HLA-A2 y componen una superficie con potencial de interactuar con el TCR.



**Figura 35. Conformación de péptidos silvestres y mutantes para AKAP6 y ASTN1 unidos a HLA-A\*02:01.** (A) Vista desde arriba de complejos AKPK6wt-HLA-A2 y AKPK6 neo- A2. (B) Vista desde arriba de complejos ASTN1wt-HLA-A2 y ASTN1 neo- A2. La versión silvestre está en amarillo y la mutante en verde cian. La mutación puntal está señalada en un círculo rojo. El HLA-A2 está en blanco (WT-HLA-A2) o en rosado (neo-HLA-A2). C. Vista lateral de los péptidos silvestre y mutante de AKPK6 superpuestos. (D) Vista lateral de los péptidos silvestre y mutante de ASTN1 superpuestos. Átomos de carbono están en amarillo (WT) o en verde cian (Neo); átomos de nitrógeno están en azul; átomos de oxígeno están en rojo.

En ambos casos se puede observar que los complejos péptido-MHC muestran desviaciones estructurales entre la versión silvestre y el neoantígeno (Figura 35C y D). En particular, en AKAP6 los péptidos silvestre y mutante se superponen en todas las cadenas laterales a excepción de P1, P3 y P6, siendo la última donde ocurre la mutación. Por su parte, en ASTN1 solo cambia P2 y P3, siendo la primera donde

ocurre la mutación. Por lo tanto, las diferencias estructurales entre los complejos péptido-MHC para la versión silvestre y la mutante en ambos neoantígenos parece no estar restringida únicamente al lugar de la mutación.

La simulación de las interacciones entre el péptido y el MHC mediante dinámica molecular permitieron observar escenarios muy diferentes durante la interacción de los dos neoantígenos con la molécula A2. Por una parte, para AKAP6 tanto la versión silvestre (Anexo 2 o link para visualizar la simulación en web browser: <https://mmb.irbbarcelona.org/3dRS/shared/61b278eec0a8d2.72605506>) como la mutante (Anexo 3 adjunto o link para visualizar la simulación en web browser: <https://mmb.irbbarcelona.org/3dRS/shared/61b27a3cdfdef2.66763559>), los péptidos se desprenden rápidamente del HLA por el extremo C-terminal pero manteniéndose anclado en el N-terminal (P1 al P5), disociándose más rápidamente el péptido mutante que el silvestre. Esto muestra que la mutación deteriora la estabilidad del péptido, pues el neoantígeno es menos estable en el tiempo de la simulación (300ns). En el caso de ASTN1 las simulaciones exponen que la versión del péptido silvestre (Anexo 4 o link para visualizar la simulación en web browser: <https://mmb.irbbarcelona.org/3dRS/shared/61b27dac052904.99817841>) se suelta del extremo N-terminal, pero se mantiene anclado al HLA por el extremo C-terminal (P7 al P10). Sin embargo, la secuencia del neoantígeno se mantiene anclado por ambos extremos al HLA durante el tiempo de la simulación. Este cambio de aminoácido en la P2 permite formar un complejo estable en el tiempo con el HLA-A2 (Anexo 5 o link para visualizar la simulación en web browser: <https://mmb.irbbarcelona.org/3dRS/shared/61b27c62dc9300.82271714>).

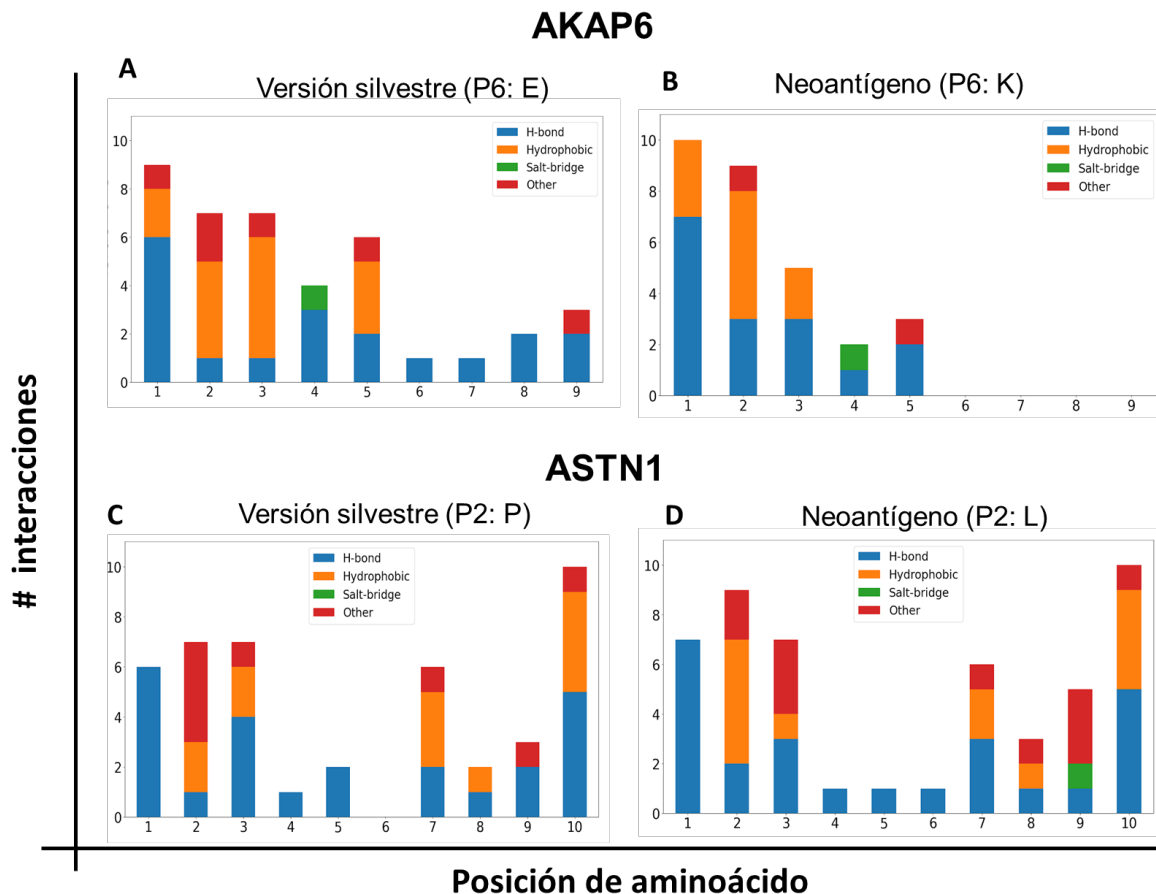
Al comparar los dos neoantígenos, se logra evidenciar que el péptido inmunogénico (ASTN1) se mantiene unido a A2 por ambos extremos (N-terminal y C-terminal) de manera estable en el tiempo. Estos resultados confirman la importancia de la estabilidad, adicional a la afinidad de unión, como factores vitales para la selección de neoantígenos inmunogénicos, pues estas dos propiedades, son claves para la formación del complejo péptido y MHC (p-MHC) con la estabilidad necesaria para

la adecuada presentación del péptido al LT y para así desencadenar una respuesta inmune.

### 7.3.4 Interacciones atómicas

Las interacciones atómicas entre péptido y HLA fueron analizadas a través de la herramienta Pycontact [120]. Pycontact es una herramienta bioinformática que permite identificar y caracterizar las interacciones no covalentes entre moléculas en una simulación de dinámica molecular. Particularmente, permite calcular la intensidad de una interacción a través de una magnitud llamada "score contact". Es decir, entre más fuerte sea la interacción entre dos átomos/residuos, mayor será el "score contact". Dicho análisis se centró en las interacciones estables en el tiempo, es decir, aquellas interacciones con una mediana de "score contact" superior a cero. En un primer momento, se analizaron la cantidad y tipo de interacciones estables, siendo los tipos de interacciones predominantes las hidrofóbica y los puentes de hidrógeno (Figura 36). Respecto a los tipos de interacciones aquí consideradas, vale la pena aclarar que la categoría "other" corresponde a aquellas interacciones que no cumplen **estrictamente** con los umbrales de clasificación de alguna de las otras categorías.

Para el caso AKAP6, a pesar de que tanto el péptido silvestre como el neoantígeno se despegan por el extremo C-terminal (más exactamente las posiciones P6 a P9), el péptido mutado presenta una reducción en la cantidad de interacciones en la parte C terminal generando que se disocie más rápido comparado con la versión silvestre (Figura 36 A y B). En el caso de ASTN1, se puede observar que la mutación en este neoantígeno genera un aumento en el número de interacciones estables con el HLA no solo en la posición donde ocurrió el cambio de aminoácido (P2), sino también en otras posiciones a distancia, como P1 y P9. Adicionalmente, en la P2 aumenta el número de interacciones hidrofóbicas con A2. Este incremento de interacciones favorece la estabilidad del complejo tal como se evidencia en la simulación molecular, pues es este péptido el que se mantiene anclado por ambos extremos, contrario al silvestre que se desprende prematuramente del extremo N-terminal (Figura 36 C y D).



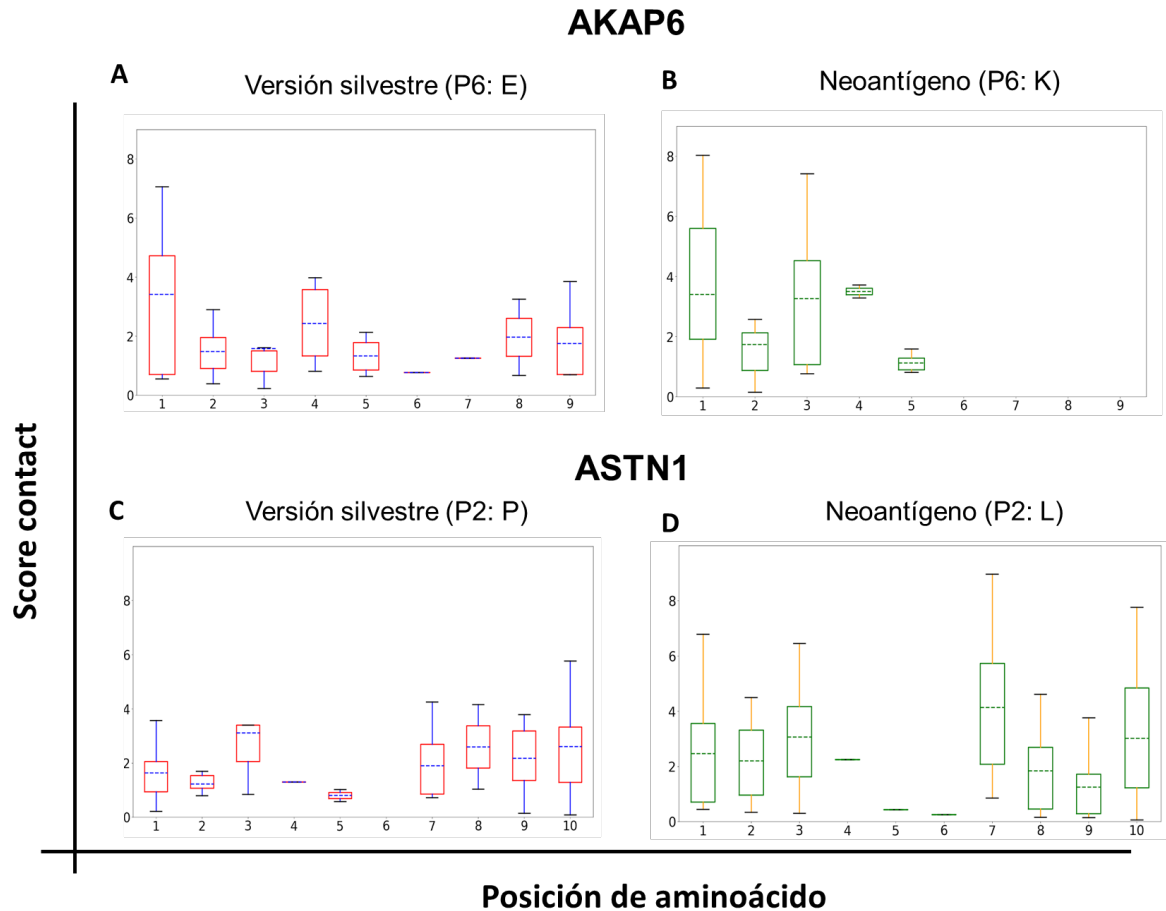
**Figura 36. Cantidad y tipo de interacciones entre cada uno de los aminoácidos de los antígenos y el HLA-A\*02:01.** Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron tanto para la versión silvestre como la mutante para ambos neoantígenos pudiendo analizar el número y tipo de interacciones no covalentes entre los aminoácidos de las epítopes y el HLA-A2 mediante la herramienta Pycontact. A y B gráficas de barras para el neoantígeno no inmunogénico AKAP6. C y D gráficas de barras para el neoantígeno inmunogénico ASTN1. En azul puentes de hidrogeno, en naranja interacciones hidrofóbicas, en verde puentes salinos y en rojo otro tipo de interacciones.

Por otro lado, resalta la variabilidad de los tipos de interacción entre neoantígenos y silvestres. Esto ilustra la complejidad de la dinámica de las interacciones entre una proteína y un péptido y ayuda a comprender por qué las herramientas actuales entrenadas principalmente en información extraída de secuencias son incapaces de predecir con exactitud la afinidad de complejos péptido-HLA.

### 7.3.5 Intensidad de las interacciones

La intensidad de interacción entre átomos/residuos presenta un gran interés a la hora de caracterizar la estabilidad de un complejo. En AKAP6 se observa un

aumento importante en la intensidad media de interacción en P3 y P4 entre la versión silvestre y la mutada (Figura 37 A y B). Sin embargo, dicho cambio se presenta irrelevante en la estabilización global del péptido, ya que en ambos casos el péptido se suelta por el extremo C-terminal.



**Figura 37. Intensidad de las interacciones entre cada uno de los aminoácidos de los antígenos con HLA-A\*02:01.** Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron tanto para la versión silvestre como la mutante para ambos neoantígenos pudiendo analizar la intensidad de las interacciones no covalentes entre los aminoácidos de las epítopes y el HLA-A2. A y B gráficas de caja y bigotes para el neoantígeno no inmunogénico AKAP6. C y D gráficas de cajas y bigotes para el neoantígeno inmunogénico ASTN1.

En cuanto a ASTN1, la mutación en P2 genera incrementos en la intensidad de interacción no solamente en el lugar de la mutación sino también en otras posiciones como es P1, P7 y P9 (Figura 37 C y D). Este resultado es particularmente interesante porque indica un impacto "deslocalizado" de una mutación puntual en la interacción global péptido-HLA, en otras palabras, una mutación puntual puede

modular las interacciones de otros aminoácidos del péptido con el HLA. También resalta el hecho que en los péptidos AKAP6 y en el neoantígeno ASTN1, los péptidos que se mantienen anclados en la parte N-terminal, el P1 cuenta tanto con una importante cantidad de interacciones de alta intensidad (incluso superior a P2, ver Figura 37), lo que indicaría que esta posición juega un rol más relevante de lo tradicionalmente aceptado en la unión y estabilidad en el extremo N-terminal.

### 7.3.6 Interacciones atómicas de P1 con el HLA en ASTN1

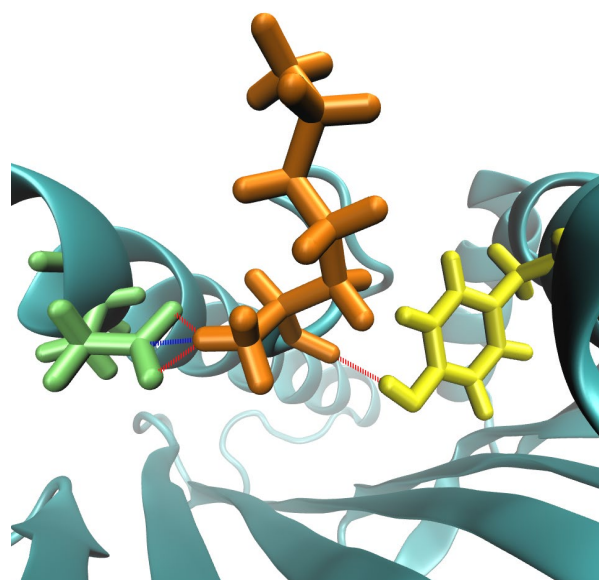
Enfocándose en las interacciones atómicas entre los péptidos ASTN1 y el HLA, particularmente en las 10 interacciones atómicas más intensas (Tabla 5), se encuentran 4 interacciones de P1 con el HLA que se encuentran diferencialmente en el neoantígeno y no en la versión silvestre, siendo 3 de las 4 interacciones puentes de hidrógeno (Figura 38). Esta observación es de gran interés ya que permite dimensionar la magnitud del efecto "deslocalizado" de la mutación en P2 sobre las otras posiciones, pues P1 se transforma en la posición que aporta las interacciones más intensas y por ende más estabilizantes en el péptido.

**Tabla 5: Top 10 interacciones atómicas entre los péptidos silvestre y mutante del neoantígenos ASTN1 y HLA-A\*02:01.** Resaltadas en amarillo se resaltan las interacciones diferencialmente expresadas en el neoantígeno con respecto a su contraparte silvestre. La nomenclatura de los átomos corresponde a la utilizada en el campo de fuerzas CHARMM36.

#	VERSIÓN SILVESTRE			NEOANTÍGENO		
	Contact Type	Mean Score	Interaction (HLA - Peptido)	Contact Type	Mean Score	Interaction (HLA - Peptido)
1	H-bond	0.977	Resid. 147, atom NE1 - Resid. 9, atom O	H-bond	0.988	Resid. 147, atom NE1 - Resid. 9, atom O
2	Other	0.961	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom C	H-bond	0.965	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom OT2
3	H-bond	0.96	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom OT1	H-bond	0.965	Resid. 159, atom OH - Resid. 1, atom O
4	H-bond	0.946	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom OT2	Other	0.96	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom C
5	Other	0.781	Resid. 143, atom OG1 - Resid. 10, atom C	H-bond	0.958	Resid. 146, atom NZ - Resid. 10, atom OT1
6	Other	0.778	Resid. 146, atom CE - Resid. 10, atom OT1	H-bond	0.944	Resid. 99, atom OH -Resid. 3, atom N



7	Other	0.759	Resid. 147, atom CD1 - Resid. 9, atom O	H-bond	0.891	Resid. 63, atom OE2 - Resid. 1, atom N
8	Other	0.734	Resid. 146, atom CE - Resid. 10, atom OT2	H-bond	0.881	Resid. 63, atom OE1 - Resid. 1, atom N
9	Other	0.715	Resid. 147, atom NE1 - Resid. 8, atom CB	H-bond	0.877	Resid. 70, atom NE2 - Resid. 7, atom NE1
10	Other	0.694	Resid. 146, atom CE - Resid. 10, atom C	Other	0.871	Resid. 63, atom CD - Resid. 1, atom N



**Figura 38. Visualización de las 4 interacciones diferencialmente presentes en el antígeno de ASTN1 respecto a su contraparte silvestre.** El primer aminoácido del neoantígeno ASTN1 (K) está representado en naranja y los aminoácidos 159 y 63 del HLA con los cuales interactúa se encuentran en amarillo y verde, respectivamente. En rojo se presentan los puentes de hidrógeno y en azul otro tipo de interacción.

### 7.3.7 Interacciones atómicas entre P2 y sus vecinos en ASTN1

Al observar que la intensidad de las interacciones de P1 con el HLA varían considerablemente entre la versión WT y el neoantígeno en ASTN1 (Figura 37 C y D), se estudió el efecto de la posición mutada sobre los aminoácidos vecinos. En este sentido, se encontró que en el péptido silvestre la P2 (una prolina) establece una interacción más fuerte con la P1 pues el contact score acumulado llega a un valor de 19,14 contra 13,33 en el caso del neoantígeno (Tabla S5 y S6). Esto podría explicar las interacciones mencionadas en la Tabla 5 que se pierden entre la P1 del

péptido silvestre y el HLA, pues la prolina estaría interfiriendo en dichas interacciones. Por otro lado, en lo que respecta a las interacciones entre la P2 y la P3, no se hallaron cambios significativos en el contact score acumulado (12,67 en el caso del silvestre y 11,72 en el caso del neoantígeno, tabla S7 y S8). Estos hallazgos resaltan la complejidad de los mecanismos de interacción y estabilización de un complejo péptido-HLA y podría ser una razón adicional por la cual las herramientas actuales son incapaces de predecir con exactitud la afinidad y estabilidad de este tipo de complejos.

## 8. Discusión

El proceso de selección de neoantígenos inmunogénicos para uso terapéutico aún está en estudio. Actualmente, la predicción de los neoantígenos mediante el uso de algoritmos computacionales para estimar la probabilidad de ser procesados por el proteasoma y presentados en las moléculas antígeno leucocitario humano (HLA) del paciente [15, 52, 67, 132, 133] es un tema en permanente evolución. Las características que predicen estas herramientas bioinformáticas para la identificación de neoantígenos inmunogénicos, se centran en la afinidad relativa de unión (IC50) [134-136] y el tiempo de unión a la molécula HLA [137]. La predicción *in-silico* hasta ahora permite tamizar una amplia lista de neoantígenos que se obtiene del análisis de las mutaciones, no obstante, se ha evidenciado que la cantidad de péptidos inmunogénicos detectados con el uso de técnicas como tetrámeros son bajos, pues se estima que en tan solo el 6% de los neoantígenos predicho es posible evidenciar precursores de LT en sangre de pacientes vacunados (37/608) [18], lo cual puede ser un reflejo de fallos en la predicción, identificación y/o selección de los neoantígenos. Por esta razón, en los últimos años se han buscado estrategias, ya sean *in-silico* o *in-vitro* que permitan mejorar el poder predictivo de los métodos *in silico* utilizados para seleccionar neoantígenos inmunogénicos.

En este trabajo se plantearon dos acercamientos diferentes para identificar y caracterizar neoantígenos con potencial inmunogénico. Por un lado, se propuso la implementación de sistemas de cultivo con células de donantes sanos para evaluar la inmunogenicidad de los neoantígenos *in-vitro*. Por otra parte, se exploró el uso de docking y dinámica molecular para identificar características moleculares asociadas a la inmunogenicidad de neoantígenos.

Los sistemas de cultivo con células de donantes sanos para la evaluación de la inmunogenicidad y detección de LT neoantígeno específicos ya han sido descritos anteriormente con resultados positivos [22, 70, 121, 138], no obstante, las metodologías usadas suelen ser complejas, costosas y laboriosas. Por tal razón, en la primera sección del presente trabajo se propuso como objetivos implementar un

sistema de cultivo *más simplificado* que permitiese detectar LT CD8+ neoantígeno específicos y caracterizar el fenotipo de memoria y expresión de marcadores de agotamiento y senescencia de estas células.

Para poder identificar un sistema de cultivo que permitiese detectar los LT neoantígeno específicos en donantes sanos, se seleccionó como HLA modelo el alelo HLA-A\*02:01 dada la alta prevalencia en la población global (incluyendo a la colombiana) [139, 140] y a estudios previos con donantes sanos en nuestro y otros laboratorios [22, 70, 124]. Para la selección de los neoantígenos restringidos a este alelo se hizo una revisión de la literatura y búsqueda en la base de datos de neoantígenos en el grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) (con fecha de corte junio de 2020) y se definieron 13 neoantígenos (cinco FS y ocho SNV), los cuales reportaban respuestas positivas en la evaluación de la inmunogenicidad *in-vitro* de estos antígenos y/o presentaban scores de afinidad y estabilidad de unión a la molécula de A2 por herramientas *in-silico*. Todos los 21 péptidos (13 neoantígenos y ocho contrapartidas silvestres) fueron evaluados *in-vitro* mediante ensayos de afinidad con células T2 (HLA-A\*02:01), dando como resultado 6/21 antígenos (5 neoantígenos y 1 péptido silvestre) con afinidad de unión a HLA-A\*02:01 (Figura 11 y Tabla S1).

Este ensayo permitió identificar varios grupos de péptidos: (i) Neoantígenos que presentan resultados de inmunogenicidad positivos en los artículos originales y buenos scores de afinidad *in-silico* e *in-vitro* por T2 (APC, TGFBR2, CDK4, EXOC8). (ii) Neoantígenos que presentan resultados positivos de inmunogenicidad en los artículos originales y buenos scores de afinidad *in-vitro* por T2, pero resultados de predicción *in-silico* deficientes (NPM1). (iii) Neoantígenos que tienen buenos scores por las herramientas *in-silico* y tienen una afinidad de unión por T2, pero resultados negativos de inmunogenicidad *in-vitro* (USF3 y POM121). (iv) Neoantígenos que tienen buenos resultados de inmunogenicidad en los artículos originales pero scores de afinidad tanto *in-silico* como *in-vitro* deficientes (KRAS, TP53). (v) Neoantígenos que tienen resultados positivos de inmunogenicidad *in-vitro* y buenos scores de afinidad *in-silico*, pero resultados negativos de afinidad *in-vitro* (SEC2A y CDC73).

Esta categorización refleja que los resultados obtenidos por T2 no permiten evaluar el panorama completo de la afinidad y otras características importantes para la presentación, reconocimiento y respuesta de los LT CD8+ a los neoantígenos. Por lo tanto, a pesar de que este tipo de ensayos de afinidad con T2 ha sido ampliamente utilizado en la literatura, este no puede ser el único ensayo *in-vitro* para determinar la inmunogenicidad de neoantígenos. No obstante, el presente trabajo resultó útil para comparar la afinidad de las versiones mutantes con sus contrapartidas silvestres.

Una vez evaluados los neoantígenos mediante el ensayo de unión por T2, se prosiguió a la evaluación de diferentes sistemas de cultivo para la detección de LT CD8+ antígeno-específicos en donantes sanos. Como se mencionó anteriormente, el uso de donantes sanos para la evaluación de neoantígenos ya ha sido utilizada anteriormente usando diversas metodologías como lo son las PBMCs totales [141-149], cocultivo de DCs con fracciones no adherentes [22, 150-154], cocultivo de DCs con LT CD8+ totales [68, 147, 155-161] y cocultivo de DCs con LT CD8+ vírgenes [70, 138, 162-164], cada uno con diversos resultados en cuanto la detección de LT antígeno específicos. La mayoría de los estudios que reportan resultados positivos han utilizado cocultivos de APCs, principalmente DCs, con LT CD8 totales o vírgenes enriquecidos, una metodología compleja por el proceso de obtención de dos tipos celulares tan específicos. Por lo tanto, en la búsqueda de un sistema de cultivo sencillo que permitiese esta detección, se planteó en primer lugar cultivos con PBMCs totales, los cuales fueron estimulados con los pools de péptidos y suplementados con las citoquinas IL-21, IL-7 e IL-15.

En este primer sistema se pudo evidenciar respuestas consistentes al pool A2, pero no para los pools de neoantígenos (Figura 12). Estos resultados probablemente respondan a la frecuencia de LT específicos en sangre periférica de donantes sanos para las epítopes virales, CMV y FLU que son epítopes de virus cuya incidencia en la población es alta [125, 126, 165, 166] y para los cuales se ha detectado en población general la persistencia de LT CD8+ en sangre con un fenotipo de memoria [110, 167-173]. Esto logró ser comprobado para el caso de CMV ya que 3/4 de los

donantes evaluados en detalle se detectó la presencia de LT CD8 específicos contra CMV (Figura 13). Sin embargo, para el caso de los péptidos asociados a tumores utilizados (TAAs: ELA y NY-ESO1) y neoantígenos se ha reportado que la prevalencia de LT respondedores en sangre periférica es baja (ELA:  $1.3 \times 10^{-4}$  y NY-ESO1:  $3.6 \times 10^{-6}$ ), tratándose principalmente de un repertorio de LT CD8+ vírgenes [70, 79, 174]. Analizando los artículos que han logrado evidenciar una respuesta a neoantígenos a nivel de PBMCs totales, las grandes diferencias con este primer sistema de cultivo es que en otros estudios utilizan epítopes largas (entre 15 y 21 aminoácidos) que favorecen una respuesta en LT CD4+ [143, 144, 149, 174] y/o utilizan varias rondas de estimulación [141, 145, 146]. Adicionalmente, dos de los artículos demuestran que la respuesta obtenida es hacia dos neoantígenos públicos y que está asociada a LT de memoria [143, 144], lo cual lo hace fácil su detección en PBMCs totales.

En varios ensayos clínicos de vacunación con neoantígenos se ha podido observar que la mayoría de las respuestas obtenidas de las células de pacientes con cáncer aparecen después de vacunación, es decir que son respuestas *de novo*, lo cual se ha atribuido a la activación del repertorio de LT vírgenes [175]. Teniendo en cuenta que en donantes sanos también se depende de la estimulación de LT vírgenes, es necesario en el sistema de cultivo la presentación de los antígenos por parte de una célula profesional presentadora de antígeno [127, 128]. Por tal razón, el segundo sistema de cultivo incorporó en el cultivo el uso de células dendríticas derivadas *in-situ* generadas a partir de PBMCs totales que presenten los antígenos a los LT en el cocultivo (acDCs). Esta estrategia ha sido utilizado anteriormente para la expansión y detección de LT CD8 específicos para FLU [111] y ELA [112], dos antígenos modelo que tienen una alta prevalencia de células respondedoras en sangre periférica (Flu de memoria, ELA Vírgenes:[109, 176]). Adicionalmente, se analizó la ventaja de realizar una ronda de estimulación adicional con PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas con los péptidos más la adición de IL-2, esto con el fin de poder expandir aquellas células efectoras específicas contra los neoantígenos.

Este segundo sistema de cultivo permitió evidenciar que después de una sola ronda de estimulación hay una mayor respuesta para el pool de A2, evidenciada por el aumento de la concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 comparado con los valores obtenidos en las PBMCs totales (Figura 12 y 14). Este patrón también pudo ser evidenciado, aunque en menor medida, en dos de los donantes para los pools de neoantígenos, pues se observaron concentraciones de citoquinas que anteriormente no eran detectadas. Una segunda ronda de estimulación favoreció la detección de LT específicos para los neoantígenos, pues en uno de los donantes se logró detectar mediante la marcación con tetrámero una discreta población de LT CD8 específicos contra el neoantígeno USF3 (0,59%). No obstante, este segundo ciclo parece ser perjudicial para el caso de pool A2 en este sistema ya que ante la reestimulación las células tienen una baja viabilidad y una pobre respuesta (Figura 16 y S5), lo cual puede deberse a que las células que estaban respondiendo al pool A2 desde el inicio probablemente son células de memoria que ante las repetidas rondas de reestimulación la presencia de IL-2 se diferencian cada vez más a células terminalmente diferenciadas y terminan muriendo resultado de un sobre-estímulo [77, 177].

Al observar que estos cambios en el sistema de cultivo aumentaban la respuesta a los neoantígenos, lo cual podría concordar con la premisa que los LT respondedores serían LT vírgenes, se planteó el enriquecimiento de LT CD8 vírgenes con el fin de aumentar la probabilidad evidenciar LTs CD8+ específicos para alguno de los neoantígenos al tener en el cultivo una mayor cantidad de linfocitos vírgenes. Por lo tanto, el tercer sistema de cultivo consistió en el cocultivo de LT CD8 vírgenes con DC *in-situ* como APCs. Este sistema fue evaluado en dos donantes (D2 y D4), en uno de ellos (D2) se logró detectar por medio de tetrámero LT CD8+ específicos contra FLU (7,11%), CMV (1,78%) y ELA (1.33%), además de una discreta respuesta a los neoantígenos por citoquinas intracelulares (CD8+ IFN- $\gamma$ +) (A2:12.46 vs Neo 3: 0.94). En el caso del otro donante (D4) se repitió lo observado en el anterior sistema de cultivo en el cual luego de la segunda ronda de estimulación se evidenció que la respuesta al pool A2 que disminuyó debido a una baja viabilidad (Figura 20 y S9). Este resultado no es lo esperado teniendo en cuenta que el cultivo

inició con LT CD8 vírgenes con una pureza de 96% de enriquecimiento, sin embargo, esto podría explicarse por la situación observada durante la obtención de las DCs *in-situ* donde al final del protocolo se observó la formación de clústeres de células que no solo incluyen a las DCs sino también a otro tipo de células que probablemente sean linfocitos estimulados por los pools de péptidos colocados el día anterior. Por lo tanto, una opción es que al momento del cocultivo entre DCs *in-situ* con los LT había una “contaminación” de células no vírgenes específicas a los antígenos del pool A2 que ante los reestímulos se ve afectada la viabilidad.

Con el fin de favorecer la presencia de células vírgenes durante el cocultivo con DCs, se propuso un último sistema de cultivo en el cual se modificó el protocolo de producción de DCs. En este cuarto sistema se evaluaron otros dos donantes diferentes (D1 y D12), logrando detectar la presencia de LT específicos para Melan-A (ELA 1.14%) y en menor medida para FLU (0,56%) y para el neoantígeno del pool Neo 2 USF3 (0.36 y 0.41%) (Figura 28). Por un lado, no es sorpresa que se logre una expansión de los LT CD8 específicos para Melan-A pues la frecuencia de LT vírgenes circulantes en donantes sanos HLA-A\*02:01 ha reportado ser 10 veces mayor que para cualquier otro antígeno propio o asociado a tumor (ELA:  $1.3 \times 10^{-4}$  vs NY-ESO1:  $3.6 \times 10^{-6}$ ). Esta diferencia en la frecuencia aun no es clara, pero se cree que debe haber una selección positiva en el timo y/o que hay una reactividad cruzada con otros antígenos [109, 176]. Por otro lado, de 13 neoantígenos evaluados solamente se logró observar un discreto porcentaje de LT CD8 específicos para el neoantígeno privado USF3, esto teniendo en cuenta en conjunto los 4 donantes del sistema 3 y 4 en que se realizó el enriquecimiento de LT CD8 vírgenes. Estos resultados son un reflejo de lo complejo que es expandir y detectar LT neoantígeno específicos en los donantes sanos, ya que en general se obtuvo expansión a muy bajas frecuencias.

El último sistema de cultivo que se llevó a cabo fue muy similar al reportado en estudios previos, sin embargo, cabe resaltar dos variaciones importantes. Primero, el método de entrega de los neoantígenos a las DCs en esos estudios fue mediante el uso de minigenes que contienen las secuencias de RNA codificante para cada



uno de los antígenos, mientras que en el presente estudio las DCs siempre fueron pulsada con péptidos. Segundo, mientras que la longitud de las epítopes suele ser de péptidos largos de hasta 21 aminoácidos, los minigenes codifican para péptidos de entre 15 y 21 aminoácidos que comprenden dentro de la secuencia epítopes MHC-I y epítopes para los LT CD4+ que quizás favorecen la expansión de LT CD8+, nuestro trabajo se manejó siempre epítopes cortas de 9 a 10 aminoácidos. El uso de los minigenes ha reportado una mejor eficiencia en la presentación de los antígenos debido al procesamiento y presentación de forma natural por parte de las APC al igual que permite evaluar una mayor cantidad de antígenos [178]. Por último, en estos ensayos se evalúa una amplia cantidad de donantes para poder detectar una respuesta, usando de 6 a 24 donantes y obteniendo respuestas en un rango de 20-40% [163, 179, 180], lo cual demuestra una heterogeneidad interindividual en la respuesta a cada neoantígeno.

Los sistemas de cultivo que incluyen el enriquecimiento de LT CD8 vírgenes han demostrado lograr no solo identificar neoepítopes inmunogénicas mediante la detección de LT neoantígeno específicos sino también el aislamiento, clonación y secuenciación de TCR [70, 138, 162, 163]. Por lo cual, no se espera inducir necesariamente en el cultivo grandes expansiones de las células específicas, sino que el aislamiento de dichas células comprende ensayos de dilución límite y obtención de clones posterior a la expansión primaria, con el fin de obtener una mayor cantidad de LT neoantígeno específicos que posibilita la secuenciación y clonación del TCR. Por lo cual, el último sistema de cultivo evaluado en este trabajo podría ser suficiente para la detección y expansión de clones y finalmente secuenciamiento de TCRs específicos con fines de inmunoterapia utilizando la transferencia adoptiva de células expandidas o la transfección lentiviral de TCR [4].

A pesar de que el repertorio de TCR humanos tiene una diversidad suficiente para identificar un amplio rango de epítopes [181], las respuestas a los neoantígenos son dependientes de la variabilidad del repertorio y de la disponibilidad de muestras de sangre de cada donante, pues estas pueden no representar el repertorio entero de LT presentes en cada individuo al igual que pueden limitar la obtención de LT

vírgenes específicos suficiente que puedan interactuar con las DCs en el cocultivo y generar una respuesta detectable con los métodos utilizados por nosotros [70]. Esta es una de las razones que pueden explicar la ausencia de respuestas en este sistema de cultivo pues la cantidad de precursores en la muestra de células utilizada limitó la obtención de LT CD8 vírgenes, al igual que la evaluación de todos los sistemas de cultivo con el mismo donante.

Por otra parte, se logró caracterizar el fenotipo de memoria y la expresión de marcadores de agotamiento (PD-1, CTLA4, LAG3) y senescencia (KLRG1) en los LT específicos para cada antígeno. La expresión de estos marcadores depende de factores tales como las células de partida, el tipo de antígeno y la estimulación continua del mismo, las citoquinas utilizadas entre otras. En este trabajo se observaron diferentes patrones según el tipo de antígeno (del pool A2 Vs. del pool de neoantígenos) al igual que el sistema de cultivo utilizado (tercer sistema Vs. cuarto sistema).

En el caso de los antígenos del pool A2 se observó como el fenotipo de memoria es más diferenciado y con una co-expresión de marcadores de agotamiento comparado a las células específicas a los neoantígenos, pues estas últimas mantienen un fenotipo virgen y una menor expresión de correceptores inhibitorios. Para el pool A2 se tiene dos escenarios diferentes dependiendo del sistema de cultivo ya que en el donante evaluado por el sistema de cultivo 3, las células exhibieron un fenotipo de memoria efectora y terminalmente diferenciado al igual que una alta expresión de marcadores de agotamiento (Figura 29), mientras que para el caso del donante evaluado por el sistema 4 no solo están presentes las poblaciones anteriormente mencionadas, sino también una prevalencia de alrededor de 40% de LT con fenotipo virgen y con expresión de máximo 2 marcadores de agotamiento (predominantemente LAG3+CTL4+ (Figura 30). Este resultado probablemente sea explicado por la presencia de LT no vírgenes debido al fenómeno anteriormente mencionado concurrente con la obtención de las DCs. En cuanto a los LT CD8 específicos contra los neoantígenos se puede observar un patrón muy similar en ambos donantes, pues se aprecia que las células

principalmente mantienen el fenotipo virgen y expresan a lo sumo un correceptor inhibitorio (Figura 31 y 32).

Por último, al comparar los LT CD8 totales de un mismo donante estimulado con el pool A2 o con el pool de neoantígenos no se observan grandes diferencias en el fenotipo de memoria, pero si en la expresión de los marcadores de agotamiento, visualizando una mayor cantidad de células expresando los correceptores comparado con las estimuladas con el pool de neoantígenos. En el caso de los LT CD8+ antígeno-específicos se observa un patrón diferente pues tanto el fenotipo de memoria como la expresión de marcadores de agotamiento son diferentes dependiendo del tipo de antígeno, pues para los antígenos del pool A2 predominan los LT de memoria efectora, mientras que para el neoantígeno son principalmente células vírgenes. De igual manera ocurre con los marcadores pues es en las células específicas para ELA las que expresan un porcentaje mayor de marcadores como LAG 3, CTLA4 y PD-1 comparado con las células específicas para el neoantígeno (Figura 33 y 34).

En el caso del fenotipo de memoria, en el sistema 3, como se describió anteriormente, parece haber la presencia de células no vírgenes en el momento del cocultivo, lo cual se ve reflejado en el fenotipo de memoria pues la mayoría de las células obtenidas eran altamente diferenciadas. Por el contrario, en el sistema de cultivo 4 se detectó la permanencia de un fenotipo virgen en al menos el 40% de los LTs CD8 totales al final del cultivo independiente del tipo de antígeno. Teniendo en cuenta que estas células ya habían sido sometidas a dos rondas de estimulación y a la presencia de IL-21, IL-7, IL-15 e IL-2 hay una alta probabilidad que estos linfocitos vírgenes (identificadas con los marcadores CD45RA y CCR7) pudiesen ser en realidad LT stem like memory (TSCM), pues estudios han evidenciado que el uso de las citoquinas IL-7, IL-15 e IL-21 solas o en combinación en los sistemas de cultivo promueven la expansión de este tipo de LT menos diferenciados [182]. Este fenotipo de memoria está caracterizado por la expresión de marcadores como CD95 y CXCR3 que logran diferenciar de las vírgenes. Adicionalmente es una población de particular interés ya que se caracterizan por tener una alta capacidad

de replicación y renovación por lo cual se proponen como las responsables de la base de la memoria inmunológica de larga duración[183].

Por su parte, la expresión y la cantidad de receptores inhibitorios en los LT CD8 totales y específicos también varía según el sistema de cultivo y antígeno, pues aquellas células estimuladas con el pool A2 y la presencia de células no vírgenes presenta una mayor expresión de estos marcadores comparado con las células provenientes del cultivo con el pool de neoantígenos. En el presente estudio se evidenció la expresión de todos los receptores, pero LAG3, CTLA4 y PD-1 fueron los que más se expresaron tanto en conjunto como individualmente. La expresión de los receptores inhibitorios en linfocitos T tiene como función canónica regular la respuesta de LT activados con el fin de prevenir el daño de tejidos por LT citotóxicos siendo esenciales para la tolerancia central y periférica, sin embargo, se ha evidenciado que ante la estimulación persistente con un antígeno los LT específicos a este aumentan la expresión sostenida de varios de receptores co-inhibitorios causando un estado disfuncional llamado agotamiento [128]. Este fenotipo agotado ha sido clásicamente descrito en el contexto de infecciones virales crónicas y cáncer y es caracterizada por pérdida progresiva de las funciones efectoras y de la proliferación en las células T activadas [86, 184, 185]. Sin embargo, la expresión de estos también se ha demostrado estar presente en individuos sanos dependiendo del fenotipo de memoria, el estado de activación y estimulación con citoquinas [186]. Por ejemplo, a medida que los LT CD8 se van diferenciado estos empiezan a expresar diferencialmente ciertos receptores co-inhibitorios como lo son KLRG1 y 2B4 es sus estados de memoria más diferenciados. De igual manera, cuando las células específicas son estimuladas con su antígeno cognato la expresión varía ligeramente, por ejemplo, para las células vírgenes ELA+ de pacientes con cáncer no expresan marcadores de agotamiento, sin embargo, cuando estos son vacunados con los péptidos las células específicas expresan PD-1, KLRG1 y TIM3 [85]. De la misma forma, se ha reportado que moléculas como LAG3 y PD-1 no son expresadas en LT vírgenes pero que su expresión puede ser inducida por la activación mediada por TCR y/o la estimulación con las citoquinas IL-2, IL-7, IL.12 e IL-15 [187-189].

Teniendo en cuenta estas observaciones, la expresión de los marcadores en los LT neoantígeno específicos en el presente trabajo no necesariamente significa que estas células estén agotadas, pues puede deberse tanto por la estimulación antigénica, el estado de activación, el fenotipo de memoria y/o la presencia de citoquinas en el cultivo. No obstante, es necesario realizar ensayos de funcionalidad que permitan evaluar si estas células están dejando de proliferar o de tener las funciones efectoras que comprueben que las células si están agotadas.

En la segunda sección de este trabajo se planteó un enfoque bioinformático basado en docking y dinámica molecular para determinar neoantígenos inmunogénicos. Clásicamente, la predicción de afinidad de unión con el MHC es evaluado por varias herramientas bioinformáticas basadas en redes neuronales entrenadas con péptidos confirmados *in-vitro* [134-136, 190], sin embargo, estas herramientas no permiten identificar cambios estructurales y características fisicoquímicas de la interacción entre el péptido y el MHC (pMHC) pues son más difíciles de analizar [191]. Estudios previos reportan la utilidad de modelos 3D de interacción entre el péptido-MHC para determinar la inmunogenicidad de los péptidos mediante la evaluación de la unión y especificidad entre pMHC y el LT [192-195].

En el presente trabajo, exploramos el uso de técnicas de simulación molecular tales como el docking y la dinámica molecular para el estudio de la interacción y estabilidad de complejos péptido-HLA. Para ello, siguiendo la línea de estudio planteada en los primeros dos objetivos, se seleccionó a AKAP6 como neoantígenos no inmunogénico y a ASTN1 como inmunogénico según los resultados obtenidos en donantes sanos [22] para usar estas herramientas *in-silico* y analizar las características que definen la inmunogenicidad de estos a nivel del complejo pMHC. Al comparar los resultados de inmunogenicidad *in-vitro* con los resultados obtenidos por las herramientas de predicción tradicionales se evidencian los fallos que pueden tener los algoritmos basados únicamente en la secuencia, pues AKPK6 es un claro falso positivo. Estos resultados se pueden explicar por la falta de información estructural de la interacción del complejo p-MHC que tienen

estas herramientas. Por lo tanto, la inclusión del docking y la dinámica molecular puede ayudar a fortalecer la predicción de neoantígenos inmunogénicos.

En lo que respecta a los casos de estudio seleccionados para este trabajo, los resultados aportados por la dinámica molecular resaltan 3 características particulares al comparar los dos neoantígenos: (i) la importancia de P1 y P2 para la unión del péptido y el MHC. (ii) El efecto deslocalizado que pueden tener las mutaciones y cómo este puede influir en la estabilidad de los péptidos. (iii) La importancia de tener una alta afinidad y estabilidad al complejo en ambos extremos.

Primero, los resultados aportados por la dinámica molecular de este estudio indican que la posición P1 del péptido juega un rol más importante en la estabilización del péptido por el N-terminal de lo que se asumía hasta ahora, pues clásicamente era la P2 y P9 los residuos de los péptidos más importantes para el anclaje al MHC [196]. Los dos neoantígenos siguen el patrón de secuencia de aminoácidos clásicamente reportado para epítopes clase I para unirse a MHC-I: X-(L/I)-X(6-7)-(V/L), donde L/I y V/L representan los residuos cuya cadena lateral ancla el péptido al MHC [196, 197]. En el caso de AKAP6 este se genera por una mutación en una posición de no anclaje (P6), pero que genera que el péptido mutante se suelte rápidamente del MHC por el C-terminal. Por su parte, en ASTN1 la mutación ocurre justo en una posición de anclaje (P2) con un cambio de una Prolina a una Leucina, la cual mejora el anclaje del péptido al MHC y aumenta la cantidad de interacciones hidrofóbicas. Estas dos características, mutaciones en los residuos de anclaje (P2 y P9) que mejoran la afinidad y aumento de hidrofobicidad de los aminoácidos, han sido reportados en la literatura como propiedades relacionadas con la inmunogenicidad, pues se generan interacciones estables entre los aminoácidos de anclaje y el HLA que permiten una correcta presentación del antígeno [198, 199]

Segundo, se evidenció el impacto "deslocalizado" de una mutación puntual en la interacción global péptido-HLA, lo que significa que una mutación puede modular las interacciones de otros aminoácidos del péptido con el HLA. Esta clase de efecto se ha evidenciado anteriormente en el contexto de la interacción con el TCR, pues ciertas mutaciones inducen cambios estructurales en los aminoácidos involucrados

en el reconocimiento por el TCR debido a las fluctuaciones de movimiento que puede tener las cadenas laterales por la mutación [200-202]. Estos cambios conformacionales pueden atribuirse a la relación especial cercana entre cadenas lateral secuenciales no adyacentes en los péptidos presentados en MHC-I [203], lo que permite que sustituciones de un aminoácido puedan alterar las interacciones inter o intra residuales que potencialmente puedan alterar la conformación y reconocimiento por parte del TCR. En conclusión, los cambios estructurales generados por mutaciones pueden contribuir a la inmunogenicidad de los neoantígenos.

Finalmente, los resultados de estabilidad de los complejos pMHC obtenidos estuvieron en concordancia con los resultados de inmunogenicidad *in-vitro*, lo que indicaría la utilidad de este tipo de estrategias *in-silico* para identificar péptidos que formen complejos estables con las proteínas HLA. Al comparar los dos neoantígenos, se logra evidenciar que el péptido inmunogénico (ASTN1) se encuentra unido a ambos extremos (N-terminal y C-terminal) de manera estable en el tiempo sobre el HLA. Estos resultados soportan la importancia de la estabilidad, adicional a la afinidad de unión, como factores vitales para la selección de neoantígenos inmunogénicos [22, 204, 205], pues son claves para la formación del complejo péptido y MHC (pMHC) necesario para la adecuada presentación del péptido al LT y así desencadenar una respuesta inmune. Adicionalmente, previos estudios han reportado falencias en la selección de neoantígenos cuando el principal o único parámetro considerado es la afinidad de unión [60, 192, 206, 207].

A pesar de que solo fueron analizados dos péptidos, los resultados permiten dar luces sobre características sobre la inmunogenicidad, no obstante, estas deben ser validadas en cohortes más grandes para poder definir el rol que tienen en la afinidad de unión y estabilidad en el MHC, y finalmente en la inmunogenicidad. Sin embargo, debido al considerable costo computacional de este tipo de estrategias, su uso se vería restringido a las etapas finales de los pipelines de identificación de neoantígenos inmunogénicos en donde queden una cantidad reducida de candidatos. Estas herramientas tienen el potencial de funcionar no solo a nivel de

la interacción dentro el péptido y el MCH sino también para determinar las interacciones entre el complejo pMHC y TCR, lo cual puede ser eventualmente implementado para seleccionar los mejores TCR con fines de terapia adoptiva de células.

El conjunto de estos resultados permite llegar a dos grandes conclusiones. Primera, el sistema de cultivo para detectar LT neoantígeno específicos debe tener células presentadoras profesionales de antígenos y LT CD8 vírgenes, sin embargo, los resultados dependen en gran medida del repertorio de TCR de los donantes, por lo cual es importante evaluar una mayor cantidad de donantes para determinar la inmunogenicidad de los neoantígenos en donantes sanos con este sistema de cultivo. Segundo, el uso del docking y la dinámica molecular permitió evidenciar que la mutación en un aminoácido puede afectar la interacción de otros aminoácidos del péptido con el MHC, al igual que permitió identificar que un neoantígeno inmunogénico debe formar un complejo péptido-MHC estable en el tiempo, por lo cual la inclusión del docking y la dinámica molecular puede ayudar a fortalecer la selección de neoantígenos inmunogénicos.

En conclusión, la inmunogenicidad es generalmente usada como un término binario, se es inmunogénico o no, pero la realidad es que la inmunogenicidad depende de muchos factores tales como la calidad del antígeno, el procesamiento y presentación de este, el repertorio de TCR al cual está expuesto el antígeno, las señales para activación de los LT, el fenotipo de memoria y la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia, entre otras cosas. Por tal razón, la búsqueda de nuevas herramientas que permitan identificar neoantígenos inmunogénicos aún están en desarrollo.

## **9. Perspectivas**

Con la realización del presente trabajo se considera que los resultados obtenidos permiten poner a prueba dos metodologías para mejorar la selección de neoantígenos inmunogénicos, pero para lograr resultados más finos y robustos se recomienda que se tengan en cuenta en fases futuras del proyecto los siguientes aspectos:



- 1. Evaluación de las metodologías tanto *in-vitro* como *in-silico* en cohortes más grandes:** Una limitación importante del presente estudio fue el número de muestras evaluadas. Por un lado, para los cultivos de células de donantes sanos tan solo 2/4 donantes tienen una discreta respuesta ante los neoantígenos, por lo cual es importante evaluar una mayor cantidad de donantes antes de afirmar que el último sistema de cultivo planteado es el ideal para evaluar la inmunogenicidad de los neoantígenos. Por el otro lado, solamente dos neoantígenos (uno inmunogénico y otro no inmunogénico) fueron analizados por docking y dinámica molecular como prueba de concepto, por lo tanto es necesario evaluar cohortes más grandes de neoantígenos, que también tengan en cuenta otras características como péptidos FS y públicos, para determinar si estas herramientas permiten mejorar la predicción de la inmunogenicidad de los neoantígenos.
- 2. Condiciones de cultivo para la expansión de LT CD8 neoantígeno específicos *in-vitro*:** el presente estudio solo utilizó una combinación de citoquinas que permitió la obtención de una baja cantidad de células tetrámero específicas pero con un fenotipo de memoria no tan diferenciado y con una expresión leve de receptores inhibitorios, sin embargo se debe considerar evaluar otras combinaciones de citoquinas de la familia de la cadena gamma común que permitan expandir una mayor cantidad de células neoantígeno específicas. Adicionalmente se sugiere evaluar si una tercera ronda de estimulación con los neoantígenos podría beneficiar la expansión de los LT específicos.
- 3. Secuenciación de TCR y ensayos de citotoxicidad:** Con base en los resultados obtenidos y los estudios reportados en cuestión del uso de células de donantes sanos, se plantea la expansión de los LT neoantígeno específicos obtenidos por tetrámero con fines de secuenciación e identificación de TCRs respondedores. Para ello se propone el aislamiento por "*sorting*" de los LT CD8+ tetrámero+ para posterior cultivo por varias semanas con condiciones que favorezcan la expansión *in-vitro* como lo son: estímulo policlonal alogénico con PBMCs alogénicas irradiadas, perlas anti-

CD28/anti-CD3 o mitógeno (PHA) en medio suplementado con IL-2. Una vez obtenida una mayor cantidad de LT CD8 específicos se debe evaluar la capacidad citotóxica de estas células para finalmente realizar la secuenciación de TCR

- 4. Uso de DCs con minigenes que codifiquen epítopes largas:** el uso de minigenes para la presentación de neoantígenos es cada vez mayor puesto que mejora el procesamiento y presentación de los antígenos por parte de las DCs, a la vez que permite evaluar una mayor cantidad de antígenos al tiempo, por lo cual podrían optimizar la evaluación de la inmunogenicidad. Adicionalmente el uso de estos permite evidenciar la respuesta tanto por CD8 como por CD4.
- 5. Simulaciones moleculares de la interacción entre el complejo pMHC y el TCR:** Las herramientas del docking y la dinámica molecular también pueden ser utilizadas para evaluar las interacciones entre el complejo pMHC y el TCR con varios propósitos. El primero sería establecer qué características tienen los neoantígenos inmunogénicos, es decir, que son tanto presentados en el MHC como reconocidos por el TCR, que les permita generar una respuesta. Segundo, determinar aquellos TCR que tengan una mayor afinidad con el pMHC para utilizar estos en terapia adoptiva de células.

## 10. Consideraciones éticas

Este proyecto de investigación se rige según la resolución No. 008430 de 1993 por la cual se establecen las "Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud" en Colombia. Capítulo I: De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos. Teniendo en cuenta el artículo 11b, se define como "Investigación con riesgo mínimo", dado que las muestras utilizadas durante este estudio provendrán de unidades "Buffy coat" de donantes sanos que donan voluntariamente sangre en las campañas del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) de la ciudad de Bogotá, quienes se encargaran de obtener el consentimiento informado de los participantes como actividad inherente a las campañas de donación. Los procedimientos para toma, almacenamiento, transporte y procesamiento de las muestras están sujetos a los protocolos del laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional de la Facultad de Medicina. El tratamiento de los datos será confidencial desde el momento de la recolección de las muestras hasta la publicación de los resultados. Este estudio fue presentado y aprobado por el comité de ética de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia bajo el aval B.FM.1.002- CE-0123-22.

## 11. Apropiación social del conocimiento

En el marco del desarrollo de este trabajo de grado, se realizaron múltiples actividades de apropiación social del conocimiento referentes tanto a los temas tratados en este proyecto como a la inmunoterapia contra el cáncer que se consideran importantes resaltar en este documento:

1. Eventos de difusión del conocimiento: Se participó en dos eventos científicos donde se socializaron los resultados de este trabajo. Primero, presentación de resultados del objetivo 1 y 2 en el simposio de Investigación en Cáncer en la Universidad Javeriana en la modalidad de presentación oral (Anexo VI). Segundo se presentaron los resultados del objetivo 3 en modalidad de poster en el XIII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (ACAAI -ACOI) (Anexo VII)
2. Creación de la página web del grupo de investigación en Inmunología y Medicina Traslacional de la Universidad Nacional de Colombia (I&MT): Basados en la búsqueda bibliográfica y los resultados obtenidos de este trabajo en conjunto con otros trabajos de grado de integrantes del grupo de Inmunología, se construyó la página web del grupo de investigación (<http://investigacionimt.unal.edu.co/grupo-imt/>)
3. Material audiovisual para personal clínico y pacientes con cáncer sobre la inmunoterapia: Basados en la búsqueda bibliográfica se construyeron: dos infografías, una impresa sobre la importancia de preservar los tumores en el desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer (Anexo VIII) y la otra una interactiva sobre la inmunoterapia contra el cáncer (Anexo IX); dos folletos informativos sobre la inmunoterapia contra el cáncer, una corta enfocada para pacientes (Anexo X) y otra con información básica para personal de salud (Anexo X). Por último, un video sobre inmunoterapia contra el cáncer (<https://www.youtube.com/watch?v=zvDrI1eICQI>).

## 12. Referencias

1. Pfister, S. and A. Ashworth, *Marked for Death: Targeting Epigenetic Changes in Cancer*. Nature reviews. Drug discovery, 2017. **16**(4).
2. Schreiber, R., L. Old, and M. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science (New York, N.Y.), 2011. **331**(6024).
3. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2021. **71**(3).
4. Wang, Z. and Y. Cao, *Adoptive Cell Therapy Targeting Neoantigens: A Frontier for Cancer Research*. Frontiers in immunology, 2020. **11**.
5. Peng, M., et al., *Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy*. Molecular cancer, 2019. **18**(1).
6. Kim, S., et al., *Adoptive Cellular Therapy with Autologous Tumor-Infiltrating Lymphocytes and T-cell Receptor-Engineered T Cells Targeting Common p53 Neoantigens in Human Solid Tumors*. Cancer immunology research, 2022. **10**(8).
7. Tran, E., et al., *T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer*. The New England journal of medicine, 2016. **375**(23).
8. Sahin, U., et al., *Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer*. Nature, 2017. **547**(7662).
9. Keskin, D., et al., *Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial*. Nature, 2019. **565**(7738).
10. Li, F., et al., *Neoantigen vaccination induces clinical and immunologic responses in non-small cell lung cancer patients harboring EGFR mutations*. Journal for immunotherapy of cancer, 2021. **9**(7).
11. Ott, P., et al., *An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma*. Nature, 2017. **547**(7662).
12. Carreno, B., et al., *Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells*. Science (New York, N.Y.), 2015. **348**(6236).
13. Jiang, T., et al., *Tumor Neoantigens: From Basic Research to Clinical Applications*. Journal of hematology & oncology, 2019. **12**(1).
14. Coulie, P., et al., *Tumour Antigens Recognized by T Lymphocytes: At the Core of Cancer Immunotherapy*. Nature reviews. Cancer, 2014. **14**(2).
15. Garcia-Garijo, A., C.A. Fajardo, and A. Gros, *Determinants for Neoantigen Identification*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1392.
16. Schumacher, T.N., W. Scheper, and P. Kvistborg, *Cancer Neoantigens*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 173-200.
17. Karpanen, T. and J. Olweus, *The Potential of Donor T-Cell Repertoires in Neoantigen-Targeted Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1718.
18. Wells, D., et al., *Key Parameters of Tumor Epitope Immunogenicity Revealed Through a Consortium Approach Improve Neoantigen Prediction*. Cell, 2020. **183**(3).
19. Bradley, P. and P. Thomas, *Using T Cell Receptor Repertoires to Understand the Principles of Adaptive Immune Recognition*. Annual review of immunology, 2019. **37**.
20. Baitsch, L., et al., *The three main stumbling blocks for anticancer T cells*. Trends Immunol, 2012. **33**(7): p. 364-72.
21. Salo-Ahen, O., et al., *Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development*. Processes, 2020. **9**(1): p. 71.

22. Stronen, E., et al., *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires*. Science, 2016. **352**(6291): p. 1337-41.
23. Rosenberg, S., et al., *Adoptive Cell Transfer: A Clinical Path to Effective Cancer Immunotherapy*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(4).
24. Ott, P., et al., *An Update on Adoptive T-Cell Therapy and Neoantigen Vaccines*. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 2019. **39**.
25. Vigneron, N., *Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy*. BioMed Research International, 2015. **2015**.
26. Pan, R., et al., *Recent Development and Clinical Application of Cancer Vaccine: Targeting Neoantigens*. Journal of immunology research, 2018. **2018**.
27. Hutchison, S. and A. Pritchard, *Identifying Neoantigens for Use in Immunotherapy*. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society, 2018. **29**(11-12).
28. Bräunlein, E. and A. Krackhardt, *Identification and Characterization of Neoantigens As Well As Respective Immune Responses in Cancer Patients*. Frontiers in immunology, 2017. **8**.
29. Smith, C.C., et al., *Alternative tumour-specific antigens*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(8): p. 465-78.
30. Turajlic, S., et al., *Insertion-and-deletion-derived Tumour-Specific Neoantigens and the Immunogenic Phenotype: A Pan-Cancer Analysis*. The Lancet. Oncology, 2017. **18**(8).
31. van der Lee, D., et al., *Mutated Nucleophosmin 1 as Immunotherapy Target in Acute Myeloid Leukemia*. The Journal of clinical investigation, 2019. **129**(2).
32. Inderberg, E., et al., *T cell therapy targeting a public neoantigen in microsatellite instable colon cancer reduces in vivo tumor growth*. Oncoimmunology, 2017. **6**(4).
33. Saeterdal, I., et al., *A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2001. **50**(9).
34. Koster, J. and R. Plasterk, *A Library of Neo Open Reading Frame Peptides (NOPs) as a Sustainable Resource of Common Neoantigens in Up to 50% of Cancer Patients*. Scientific reports, 2019. **9**(1).
35. PM, A., *Cellular Therapy Against Public Neoantigens*. The Journal of clinical investigation, 2019. **129**(2).
36. Verdon, D. and M. Jenkins, *Identification and Targeting of Mutant Peptide Neoantigens in Cancer Immunotherapy*. Cancers, 2021. **13**(16).
37. Yossef, R., et al., *Enhanced Detection of Neoantigen-Reactive T Cells Targeting Unique and Shared Oncogenes for Personalized Cancer Immunotherapy*. JCI insight, 2018. **3**(19).
38. Zhou, J., et al., *Neoantigens Derived from Recurrently Mutated Genes as Potential Immunotherapy Targets for Gastric Cancer*. BioMed Research International, 2019. **2019**.
39. Olivera, I., et al., *Exploiting TCR Recognition of Shared Hotspot Oncogene-encoded Neoantigens*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2020. **26**(6).
40. Cafri, G., et al., *Memory T Cells Targeting Oncogenic Mutations Detected in Peripheral Blood of Epithelial Cancer Patients*. Nature communications, 2019. **10**(1).
41. Schultz, N., et al., *Frequencies and Prognostic Role of KRAS and BRAF Mutations in Patients With Localized Pancreatic and Ampullary Adenocarcinomas*. Pancreas, 2012. **41**(5).
42. Chen, F., et al., *Neoantigen Identification Strategies Enable Personalized Immunotherapy in Refractory Solid Tumors*. The Journal of clinical investigation, 2019. **129**(5).
43. McGranahan, N., et al., *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade*. Science (New York, N.Y.), 2016. **351**(6280).

44. Wolf, Y., et al., *UVB-Induced Tumor Heterogeneity Diminishes Immune Response in Melanoma*. Cell, 2019. **179**(1).
45. Klebanoff, C. and J. Wolchok, *Shared Cancer Neoantigens: Making Private Matters Public*. The Journal of experimental medicine, 2018. **215**(1).
46. Lugli, E., P. Kvistborg, and G. Galletti, *Cancer Neoantigens Targeted by Adoptive T Cell Transfer: Private No More*. The Journal of clinical investigation, 2019. **129**(3).
47. Pearlman, A., et al., *Targeting public neoantigens for cancer immunotherapy*. Nature cancer, 2021. **2**(5).
48. Castle, J., et al., *Mutation-Derived Neoantigens for Cancer Immunotherapy*. Frontiers in immunology, 2019. **10**.
49. Bassani-Sternberg, M., *Mass Spectrometry Based Immunopeptidomics for the Discovery of Cancer Neoantigens*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2018. **1719**.
50. Yavad, M., et al., *Predicting Immunogenic Tumour Mutations by Combining Mass Spectrometry and Exome Sequencing*. Nature, 2014. **515**(7528).
51. Trolle, T. and M. Nielsen, *NetTepi: An Integrated Method for the Prediction of T Cell Epitopes*. Immunogenetics, 2014. **66**(7-8).
52. Hundal, J., et al., *pVACtools: A Computational Toolkit to Identify and Visualize Cancer Neoantigens*. Cancer immunology research, 2020. **8**(3).
53. Lee, C., et al., *Update on Tumor Neoantigens and Their Utility: Why It Is Good to Be Different*. Trends in immunology, 2018. **39**(7).
54. Nonomura, C., et al., *Identification of a neoantigen epitope in a melanoma patient with good response to anti-PD-1 antibody therapy*. Immunol Lett, 2019. **208**: p. 52-59.
55. Wells, D., et al., *Key Parameters of Tumor Epitope Immunogenicity Revealed Through a Consortium Approach Improve Neoantigen Prediction*. Cell, 2020. **183**(3).
56. Bassani-Sternberg, M., et al., *Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2015. **14**(3).
57. Richters, M., et al., *Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility*. Genome medicine, 2019. **11**(1).
58. Vitiello, A. and M. Zanetti, *Neoantigen Prediction and the Need for Validation*. Nature biotechnology, 2017. **35**(9).
59. Kim, Y., et al., *Dataset size and composition impact the reliability of performance benchmarks for peptide-MHC binding predictions*. BMC bioinformatics, 2014. **15**(1).
60. Capietto, A., S. Jhunjhunwala, and L. Delamarre, *Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy*. Current opinion in immunology, 2017. **46**.
61. Kishton, R., R. Lynn, and N. Restifo, *Strength in Numbers: Identifying Neoantigen Targets for Cancer Immunotherapy*. Cell, 2020. **183**(3).
62. Roerden, M., A. Nelde, and J. Walz, *Neoantigens in Hematological Malignancies-Ultimate Targets for Immunotherapy?* Frontiers in immunology, 2019. **10**
63. Wagner, S., C.S. Mullins, and M. Linnebacher, *Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(48): p. 5418-32.
64. Biernacki, M. and M. Bleakley, *Neoantigens in Hematologic Malignancies*. Frontiers in immunology, 2020. **11**.
65. Peng, S., et al., *Sensitive Detection and Analysis of Neoantigen-Specific T Cell Populations From Tumors and Blood*. Cell reports, 2019. **28**(10).
66. Bentzen, A. and S. Hadrup, *Evolution of MHC-based Technologies Used for Detection of Antigen-Responsive T Cells*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2017. **66**(5).

67. Arnaud, M., et al., *Biotechnologies to Tackle the Challenge of Neoantigen Identification*. Current opinion in biotechnology, 2020. **65**.
68. Kato, T., et al., *Effective Screening of T Cells Recognizing Neoantigens and Construction of T-cell Receptor-Engineered T Cells*. Oncotarget, 2018. **9**(13).
69. Reading, J., et al., *The Function and Dysfunction of Memory CD8 + T Cells in Tumor Immunity*. Immunological reviews, 2018. **283**(1).
70. Ali, M., et al., *Induction of neoantigen-reactive T cells from healthy donors*. Nat Protoc, 2019. **14**(6): p. 1926-1943.
71. Yadav, M. and L. Delamarre, *IMMUNOTHERAPY. Outsourcing the Immune Response to Cancer*. Science (New York, N.Y.), 2016. **352**(6291).
72. Yamamoto, T.N., R.J. Kishton, and N.P. Restifo, *Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors*. Nat Med, 2019. **25**(10): p. 1488-1499.
73. Chapuis, A., et al., *Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients*. Science translational medicine, 2013. **5**(174).
74. Ohminami, H., M. Yasukawa, and S. Fujita, *HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide*. Blood, 2000. **95**(1).
75. Barnes, E., et al., *Ultra-sensitive Class I Tetramer Analysis Reveals Previously Undetectable Populations of Antiviral CD8+ T Cells*. European journal of immunology, 2004. **34**(6).
76. Koning, D., et al., *In Vitro Expansion of Antigen-Specific CD8(+) T Cells Distorts the T-cell Repertoire*. Journal of immunological methods, 2014. **405**.
77. Montes, M., et al., *Optimum in Vitro Expansion of Human Antigen-Specific CD8 T Cells for Adoptive Transfer Therapy*. Clinical and experimental immunology, 2005. **142**(2).
78. Dwyer, C., et al., *Fueling Cancer Immunotherapy With Common Gamma Chain Cytokines*. Frontiers in immunology, 2019. **10**.
79. Wölfl, M. and P. Greenberg, *Antigen-specific Activation and Cytokine-Facilitated Expansion of Naive, Human CD8+ T Cells*. Nature protocols, 2014. **9**(4).
80. Shevach, E., *Mechanisms of foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression*. Immunity, 2009. **30**(5).
81. Gao, J., et al., *Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy*, in *Int J Mol Sci*. 2015. p. 10267-80.
82. Steel, J., T. Waldmann, and J. Morris, *Interleukin-15 Biology and Its Therapeutic Implications in Cancer*. Trends in pharmacological sciences, 2012. **33**(1).
83. Li, Y. and C. Yee, *IL-21 Mediated Foxp3 Suppression Leads to Enhanced Generation of Antigen-Specific CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes*. Blood, 2008. **111**(1).
84. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 486-99.
85. Legat, A., et al., *Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation Than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells*. Frontiers in immunology, 2013. **4**.
86. Thommen, D. and T. Schumacher, *T Cell Dysfunction in Cancer*. Cancer cell, 2018. **33**(4).
87. Gonzalez, M. and M. Kann, *Chapter 4: Protein interactions and disease*. PLoS computational biology, 2012. **8**(12).
88. London, N., B. Raveh, and O. Schueler-Furman, *Peptide docking and structure-based characterization of peptide binding: from knowledge to know-how*. Current opinion in structural biology, 2013. **23**(6).
89. Janes, M., et al., *Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor*. Cell, 2018. **172**(3).



90. Ferreira, L., et al., *Molecular docking and structure-based drug design strategies*. Molecules (Basel, Switzerland), 2015. **20**(7).
91. Graves, J., et al., *A Review of Deep Learning Methods for Antibodies*. Antibodies (Basel, Switzerland), 2020. **9**(2).
92. Lengauer, T. and M. Rarey, *Computational methods for biomolecular docking*. Current opinion in structural biology, 1996. **6**(3).
93. Pinzi, L. and G. Rastelli, *Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(18).
94. Ciemny, M., et al., *Protein-peptide docking: opportunities and challenges*. Drug discovery today, 2018. **23**(8).
95. Mahapatra, S., et al., *Immunoinformatics and molecular docking studies reveal a novel Multi-Epitope peptide vaccine against pneumonia infection*. Vaccine, 2021. **39**(42).
96. Krüger, D., et al., *Structure-Based Design of Non-natural Macrocyclic Peptides That Inhibit Protein-Protein Interactions*. Journal of medicinal chemistry, 2017. **60**(21).
97. Salmaso, V. and S. Moro, *Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**.
98. Bitencourt-Ferreira, G. and W. de Azevedo, *Molecular Dynamics Simulations with NAMD2*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2019. **2053**.
99. Wang, J., et al., *Improved Modeling of Peptide-Protein Binding Through Global Docking and Accelerated Molecular Dynamics Simulations*. Frontiers in molecular biosciences, 2019. **6**.
100. Hollingsworth, S. and R. Dror, *Molecular Dynamics Simulation for All*. Neuron, 2018. **99**(6).
101. Kumar, N. and D. Mohanty, *Structure-based identification of MHC binding peptides: Benchmarking of prediction accuracy*. 2010.
102. Mei, X., et al., *The Use of Molecular Dynamics Simulation Method to Quantitatively Evaluate the Affinity between HBV Antigen T Cell Epitope Peptides and HLA-A Molecules*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(9).
103. Mirza, M., et al., *Towards peptide vaccines against Zika virus: Immunoinformatics combined with molecular dynamics simulations to predict antigenic epitopes of Zika viral proteins*. Scientific reports, 2016. **6**.
104. Rantam, F., et al., *Molecular docking and dynamic simulation of conserved B cell epitope of SARS-CoV-2 glycoprotein Indonesian isolates: an immunoinformatic approach*. F1000Research, 2021. **10**.
105. Riley, T., et al., *Structure Based Prediction of Neoantigen Immunogenicity*. Frontiers in immunology, 2019. **10**.
106. Pang, Y., et al., *Peptide-Binding Groove Contraction Linked to the Lack of T Cell Response: Using Complex Structure and Energy To Identify Neoantigens*. ImmunoHorizons, 2018. **2**(7).
107. Tram, C., O. Hrytsenko, and M. Stanford, *Optimization of the T2 HLA-A2 shift assay for testing of the biological activity of immunotherapies*. 2019.
108. Kessler, J., et al., *Competition-based Cellular Peptide Binding Assay for HLA Class I*. Current protocols in immunology, 2004. **Chapter 18**.
109. Alanio, C., et al., *Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies*. Blood, 2010. **115**(18).
110. McLaughlin-Taylor, E., et al., *Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes*. Journal of medical virology, 1994. **43**(1).
111. Martinuzzi, E., et al., *acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses*. Blood, 2011. **118**(8).

112. Kuranda, K., et al., *In Vitro Expansion of Anti-viral T Cells from Cord Blood by Accelerated Co-cultured Dendritic Cells*. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 2018. **13**.
113. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 2000. **28**(1): p. 235-242.
114. Raveh, B., et al., *Rosetta FlexPepDock ab-initio: simultaneous folding, docking and refinement of peptides onto their receptors*. *PloS one*, 2011. **6**(4).
115. Leaver-Fay, A., et al., *ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules*. *Methods in enzymology*, 2011. **487**.
116. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. *Journal of molecular graphics*, 1996. **14**(1).
117. Phillips, J., et al., *Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD*. *The Journal of chemical physics*, 2020. **153**(4).
118. Huang, J. and A. MacKerell, *CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data*. *Journal of computational chemistry*, 2013. **34**(25).
119. Bayarri, G., A. Hospital, and M. Orozco, *3dRS, a Web-Based Tool to Share Interactive Representations of 3D Biomolecular Structures and Molecular Dynamics Trajectories*. *Frontiers in molecular biosciences*, 2021. **8**.
120. Scheurer, M., et al., *PyContact: Rapid, Customizable, and Visual Analysis of Noncovalent Interactions in MD Simulations*. *Biophysical journal*, 2018. **114**(3).
121. Choi, J., et al., *Systematic discovery and validation of T cell targets directed against oncogenic KRAS mutations*. *Cell reports methods*, 2021. **1**(5).
122. Lo, W., et al., *Immunologic Recognition of a Shared p53 Mutated Neoantigen in a Patient with Metastatic Colorectal Cancer*. *Cancer immunology research*, 2019. **7**(4).
123. Malekzadeh, P., et al., *Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers*. *The Journal of clinical investigation*, 2019. **129**(3).
124. Chamucero-Millares, J., D. Bernal-Estévez, and C. Parra-López, *Usefulness of IL-21, IL-7, and IL-15 conditioned media for expansion of antigen-specific CD8+ T cells from healthy donor-PBMCs suitable for immunotherapy*. *Cellular immunology*, 2021. **360**.
125. Rico, A., et al., *Epidemiology of cytomegalovirus Infection among mothers and infants in Colombia*. *Journal of medical virology*, 2021. **93**(11).
126. Feng-Qin, F., et al., *Incidence of Cytomegalovirus Infection in Shanghai, China*. 2009.
127. Mueller, D., M. Jenkins, and R. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. *Annual review of immunology*, 1989. **7**.
128. Chen, L. and D. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. *Nature reviews. Immunology*, 2013. **13**(4).
129. Cui, W. and S. Kaech, *Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells*. *Immunological reviews*, 2010. **236**.
130. Kalia, V. and S. Sarkar, *Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**.
131. Drijfhout, J., et al., *Detailed motifs for peptide binding to HLA-A\*0201 derived from large random sets of peptides using a cellular binding assay*. *Human immunology*, 1995. **43**(1).
132. Jou, J., et al., *The Changing Landscape of Therapeutic Cancer Vaccines-Novel Platforms and Neoantigen Identification*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2021. **27**(3).
133. Blass, E. and P. Ott, *Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines*. *Nature reviews. Clinical oncology*, 2021. **18**(4).

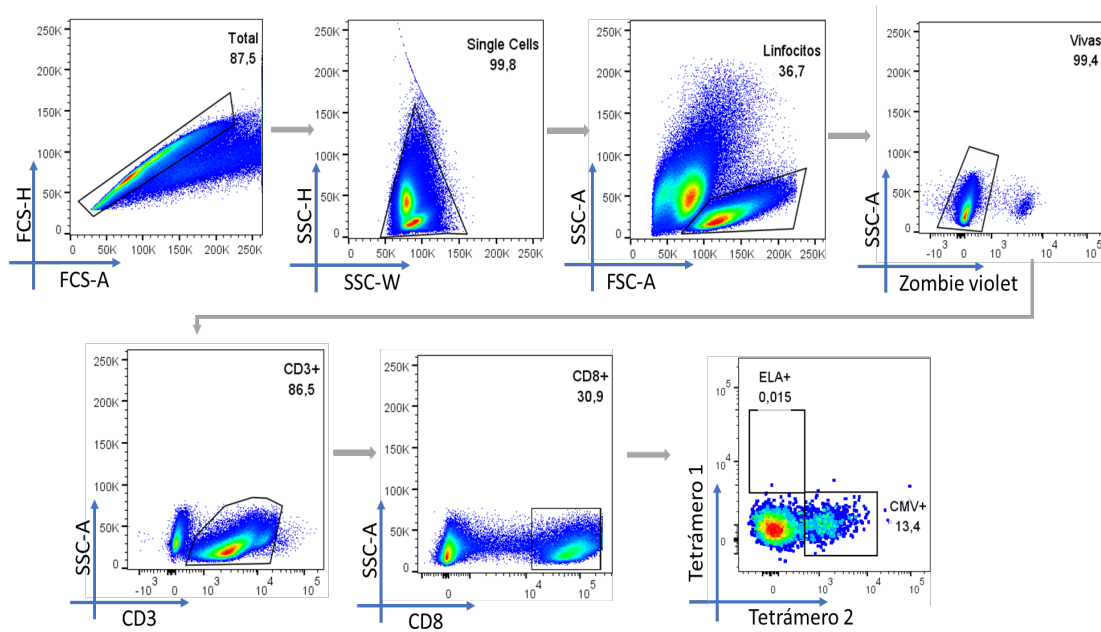
134. Jurtz, V., et al., *NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2017. **199**(9).
135. O'Donnell, T., et al., *MHCflurry: Open-Source Class I MHC Binding Affinity Prediction*. Cell systems, 2018. **7**(1).
136. Zhang, H., O. Lund, and M. Nielsen, *The PickPocket method for predicting binding specificities for receptors based on receptor pocket similarities: application to MHC-peptide binding*. Bioinformatics (Oxford, England), 2009. **25**(10).
137. Jørgensen, K., et al., *NetMHCstab - predicting stability of peptide-MHC-I complexes; impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery*. Immunology, 2014. **141**(1).
138. Chandran, S., et al., *Immunogenicity and therapeutic targeting of a public neoantigen derived from mutated PIK3CA*. Nature medicine, 2022. **28**(5).
139. Páez-Gutiérrez, I., et al., *HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies of 1463 umbilical cord blood units typed in high resolution from Bogotá, Colombia*. Human immunology, 2019. **80**(7).
140. Gonzalez-Galarza, F., et al., *Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools*. Nucleic acids research, 2020. **48**(D1).
141. Akazawa, Y., et al., *Efficacy of immunotherapy targeting the neoantigen derived from epidermal growth factor receptor T790M/C797S mutation in non-small cell lung cancer*. Cancer science, 2020. **111**(8).
142. Yamada, T., et al., *EGFR T790M mutation as a possible target for immunotherapy; identification of HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes derived from the EGFR T790M mutation*. PloS one, 2013. **8**(11).
143. Holmström, M. and M. Andersen, *Healthy Donors Harbor Memory T Cell Responses to RAS Neo-Antigens*. Cancers, 2020. **12**(10).
144. Holmström, M., et al., *High frequencies of circulating memory T cells specific for calreticulin exon 9 mutations in healthy individuals*. Blood cancer journal, 2019. **9**(2).
145. Wu, Y., et al., *HLA-A2-Restricted Epitopes Identified from MTA1 Could Elicit Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Response*. Journal of immunology research, 2018. **2018**.
146. Hu, Z., et al., *A cloning and expression system to probe T-cell receptor specificity and assess functional avidity to neoantigens*. Blood, 2018. **132**(18).
147. Chheda, Z., et al., *Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy*. The Journal of experimental medicine, 2018. **215**(1).
148. Han, K., et al., *Streamlined selection of cancer antigens for vaccine development through integrative multi-omics and high-content cell imaging*. Scientific reports, 2020. **10**(1).
149. Flatmark, K., et al., *Peptide vaccine targeting mutated GNAS: a potential novel treatment for pseudomyxoma peritonei*. Journal for immunotherapy of cancer, 2021. **9**(10).
150. Wang, Z., et al., *Identification of HLA-A2-Restricted Mutant Epitopes from Neoantigens of Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. Vaccines, 2021. **9**(10).
151. Iizumi, S., et al., *Identification of Novel HLA Class II-Restricted Neoantigens Derived from Driver Mutations*. Cancers, 2019. **11**(2).
152. Nielsen, J., et al., *Mapping the human T cell repertoire to recurrent driver mutations in MYD88 and EZH2 in lymphoma*. Oncoimmunology, 2017. **6**(7).
153. Rivero-Hinojosa, S., et al., *Proteogenomic discovery of neoantigens facilitates personalized multi-antigen targeted T cell immunotherapy for brain tumors*. Nature communications, 2021. **12**(1).

154. Shi, R., et al., *Screening and identification of HLA-A2-restricted neoepitopes for immunotherapy of non-microsatellite instability-high colorectal cancer*. Science China. Life sciences, 2022. **65**(3).
155. Tang, Y., et al., *The co-stimulation of anti-CD28 and IL-2 enhances the sensitivity of ELISPOT assays for detection of neoantigen-specific T cells in PBMC*. Journal of immunological methods, 2020. **484-485**.
156. Galloway, S., et al., *Peptide Super-Agonist Enhances T-Cell Responses to Melanoma*. Frontiers in immunology, 2019. **10**.
157. Greiner, J., et al., *Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(6).
158. Matsuda, T., et al., *Induction of Neoantigen-Specific Cytotoxic T Cells and Construction of T-cell Receptor-Engineered T Cells for Ovarian Cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2018. **24**(21).
159. Paret, C., et al., *Identification of an Immunogenic Medulloblastoma-Specific Fusion Involving EPC2 and GULP1*. Cancers, 2021. **13**(22).
160. Biernacki, M., et al., *CBFB-MYH11 fusion neoantigen enables T cell recognition and killing of acute myeloid leukemia*. The Journal of clinical investigation, 2020. **130**(10).
161. Bear, A.S., et al., *Biochemical and functional characterization of mutant KRAS epitopes validates this oncoprotein for immunological targeting*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 1-16.
162. Shinkawa, T., et al., *Characterization of CD8 + T-cell responses to non-anchor-type HLA class I neoantigens with single amino-acid substitutions*. Oncoimmunology, 2021. **10**(1).
163. Çınar, Ö., et al., *High-affinity T-cell receptor specific for MyD88 L265P mutation for adoptive T-cell therapy of B-cell malignancies*. Journal for immunotherapy of cancer, 2021. **9**(7).
164. Lazdun, Y., et al., *A New Pipeline to Predict and Confirm Tumor Neoantigens Predict Better Response to Immune Checkpoint Blockade*. Molecular cancer research : MCR, 2021. **19**(3).
165. Colugnati, F., et al., *Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States*. BMC infectious diseases, 2007. **7**.
166. Tokars, J.I., et al., *Seasonal Incidence of Symptomatic Influenza in the United States*. Clinical Infectious Diseases, 2018. **66**(10): p. 1511-1518.
167. Wills, M., et al., *The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL*. Journal of virology, 1996. **70**(11).
168. Gamadia, L., et al., *Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers*. Blood, 2001. **98**(3).
169. He, X., et al., *High frequencies cytomegalovirus pp65(495-503)-specific CD8+ T cells in healthy young and elderly Chinese donors: characterization of their phenotypes and TCR Vbeta usage*. Journal of clinical immunology, 2006. **26**(5).
170. Choo, J., et al., *The immunodominant influenza A virus M158-66 cytotoxic T lymphocyte epitope exhibits degenerate class I major histocompatibility complex restriction in humans*. Journal of virology, 2014. **88**(18).
171. Soema, P., et al., *Whole-Inactivated Influenza Virus Is a Potent Adjuvant for Influenza Peptides Containing CD8 + T Cell Epitopes*. Frontiers in immunology, 2018. **9**.
172. Sridhar, S., et al., *Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza*. Nature medicine, 2013. **19**(10).

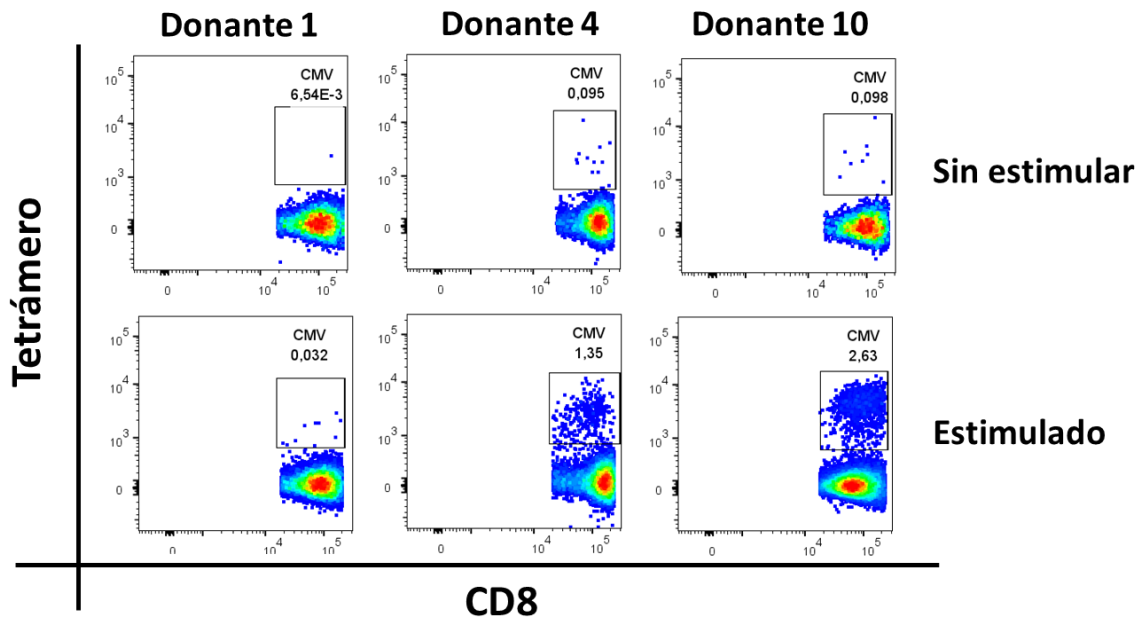
173. Jin, X., et al., *High frequency of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-effector cells in HLA-A\*0201-positive subjects during multiple viral coinfections*. The Journal of infectious diseases, 2000. **181**(1).
174. Cimen Bozkus, C., et al., *Immune Checkpoint Blockade Enhances Shared Neoantigen-Induced T-cell Immunity Directed against Mutated Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms*. Cancer discovery, 2019. **9**(9).
175. Ott, P., et al., *A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer*. Cell, 2020. **183**(2).
176. Pittet, M., et al., *High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals*. The Journal of experimental medicine, 1999. **190**(5).
177. Hinrichs, C., et al., *IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy*. Blood, 2008. **111**(11).
178. Hondowicz, B., et al., *Discovery of T cell antigens by high-throughput screening of synthetic minigene libraries*. PloS one, 2012. **7**(1).
179. Grunert, C., et al., *Isolation of Neoantigen-Specific Human T Cell Receptors from Different Human and Murine Repertoires*. Cancers, 2022. **14**(7).
180. Roudko, V., et al., *Shared Immunogenic Poly-Epitope Frameshift Mutations in Microsatellite Unstable Tumors*. Cell, 2020. **183**(6).
181. Arstila, T., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science (New York, N.Y.), 1999. **286**(5441).
182. Cieri, N., et al., *IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors*. Blood, 2013. **121**(4).
183. Gattinoni, L., et al., *T memory stem cells in health and disease*. Nature medicine, 2017. **23**(1).
184. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. Nature Immunology, 2008. **10**(1): p. 29-37.
185. Zhao, Y., Q. Shao, and G. Peng, *Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment*. Cellular & molecular immunology, 2020. **17**(1).
186. Fuertes Marraco, S., et al., *Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion*. Frontiers in immunology, 2015. **6**.
187. Bruniquel, D., et al., *Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II*. Immunogenetics, 1998. **48**(2).
188. Annunziato, F., et al., *Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1996. **10**(7).
189. Kinter, A., et al., *The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2008. **181**(10).
190. Andreatta, M. and M. Nielsen, *Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system*. Bioinformatics (Oxford, England), 2016. **32**(4).
191. Perez, M., et al., *Structural Prediction of Peptide-MHC Binding Modes*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2022. **2405**.
192. Brennick, C., et al., *An unbiased approach to defining bona fide cancer neoepitopes that elicit immune-mediated cancer rejection*. The Journal of clinical investigation, 2021. **131**(3).

193. Hellman, L., et al., *Improving T Cell Receptor On-Target Specificity via Structure-Guided Design*. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2019. **27**(2).
194. Wu, D., et al., *Structural basis for oligoclonal T cell recognition of a shared p53 cancer neoantigen*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 1-12.
195. Bai, P., et al., *Rational discovery of a cancer neoepitope harboring the KRAS G12D driver mutation*. *Science China. Life sciences*, 2021. **64**(12).
196. Garboczi, D., et al., *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. *Nature*, 1996. **384**(6605).
197. Malonis, R., J. Lai, and O. Vergnolle, *Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges*. *Chemical reviews*, 2020. **120**(6).
198. Duan, F., et al., *Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity*. *The Journal of experimental medicine*, 2014. **211**(11).
199. Sarkizova, S., et al., *A large peptidome dataset improves HLA class I epitope prediction across most of the human population*. *Nature biotechnology*, 2020. **38**(2).
200. Devlin, J., et al., *Structural dissimilarity from self drives neoepitope escape from immune tolerance*. *Nature chemical biology*, 2020. **16**(11).
201. Sharma, A., et al., *Class I major histocompatibility complex anchor substitutions alter the conformation of T cell receptor contacts*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(24).
202. Borbulevych, O., et al., *Structures of MART-126/27-35 Peptide/HLA-A2 complexes reveal a remarkable disconnect between antigen structural homology and T cell recognition*. *Journal of molecular biology*, 2007. **372**(5).
203. Theodossis, A., et al., *Constraints within major histocompatibility complex class I restricted peptides: presentation and consequences for T-cell recognition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(12).
204. Harndahl, M., et al., *Peptide-MHC class I stability is a better predictor than peptide affinity of CTL immunogenicity*. *European journal of immunology*, 2012. **42**(6).
205. van der Burg, S., et al., *Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1996. **156**(9).
206. Capietto, A., et al., *Mutation position is an important determinant for predicting cancer neoantigens*. *The Journal of experimental medicine*, 2020. **217**(4).
207. Feltkamp, M., et al., *Efficient MHC class I-peptide binding is required but does not ensure MHC class I-restricted immunogenicity*. *Molecular immunology*, 1994. **31**(18).

### 13. Figuras suplementarias

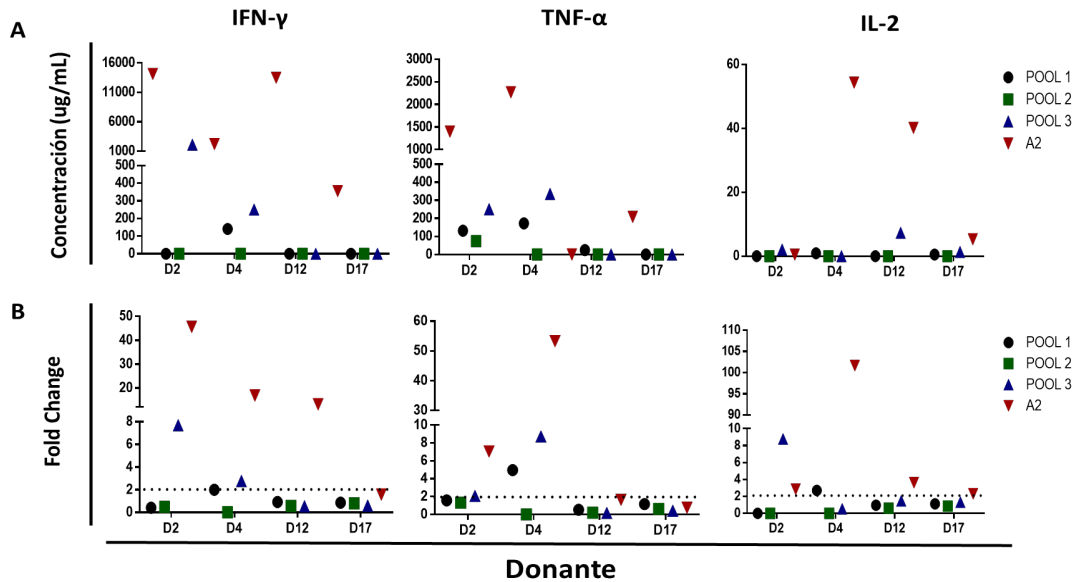


**Figura S1. Estrategia de “gating” para la identificación de LT CD8 antígeno específico mediante la marcación doble de tetrámero.** Las células eran marcadas con *Zombie Violet* como marcador de viabilidad y posterior marcación doble de tetrámero y antígenos superficiales CD3 y CD8. Se determinó la población linfoide mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los LT CD8+ se estableció el porcentaje de células tetrámero-positivas para cada uno de los tetrámero.

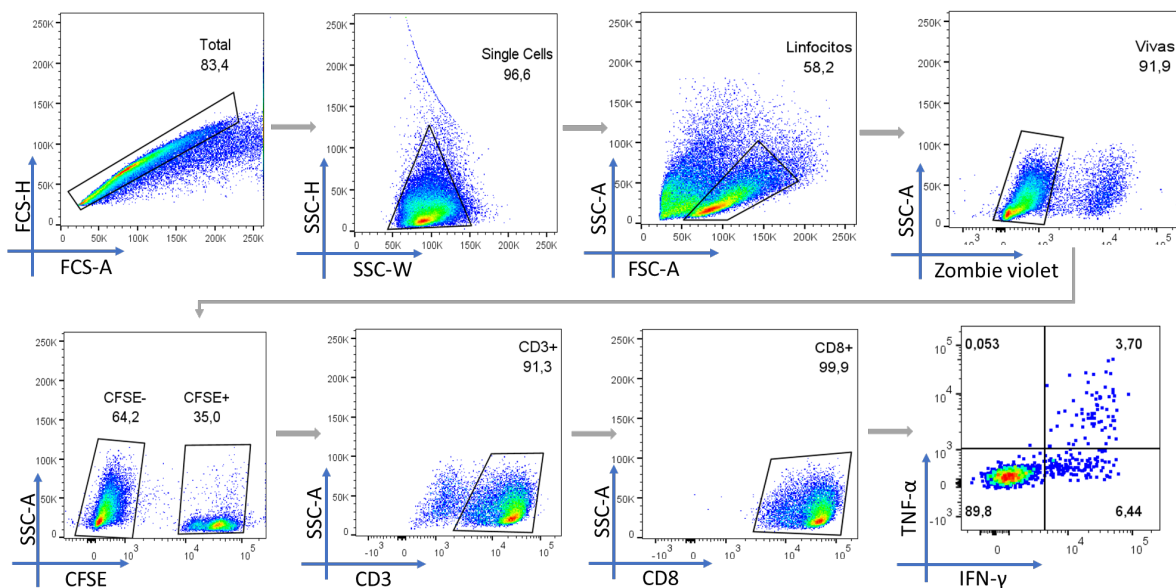


**Figura S2. Expansión in vitro de LT CD8+ específicos a la epítoto CMV mediante el primer sistema de cultivo.** PBMCs totales de tres donantes sanos distintos fueron estimuladas o no con el péptido de CMV. El cultivo se suplementó con IL-21 (30 ng/mL) las primeras 72 horas y luego se

adicionaron tres dosis de IL-7 e IL-15 (5 ng/mL cada una). Al día 9 del cocultivo se determinó la población CD8+ tetrámero positiva.

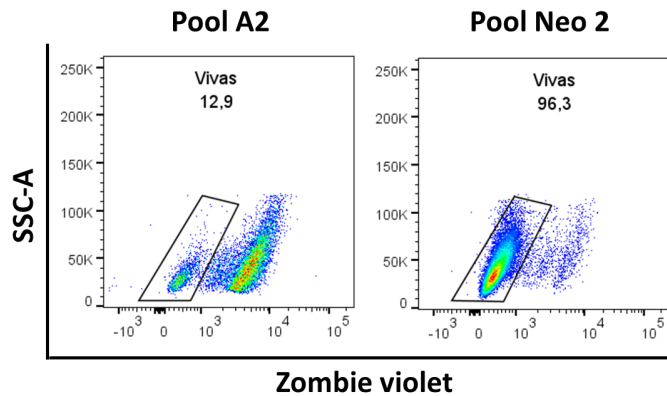


**Figura S3. Concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 secretadas en el cultivo de acDCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.** Se determinó la concentración (pg/mL) de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 mediante CBA del sobrenadante de cultivos de acDCs (re)estimados alguno de los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) para los cuatro donantes (A). Se calculó el *Fold change* de la concentración con respecto a los valores obtenidos en el sobrenadantes de células sin estimular. La línea punteada se encuentra resaltando aquellos valores de citoquinas superaban un Fold change de 2 (B).

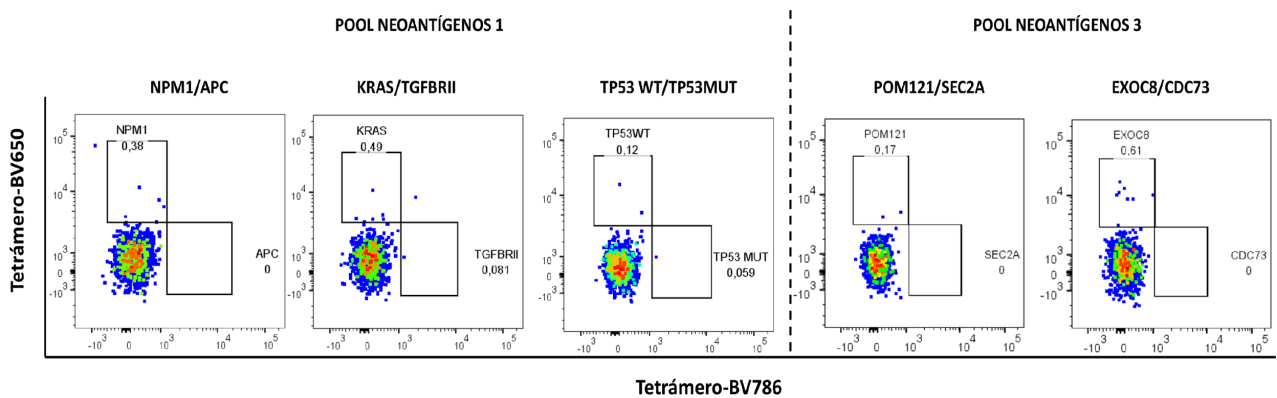




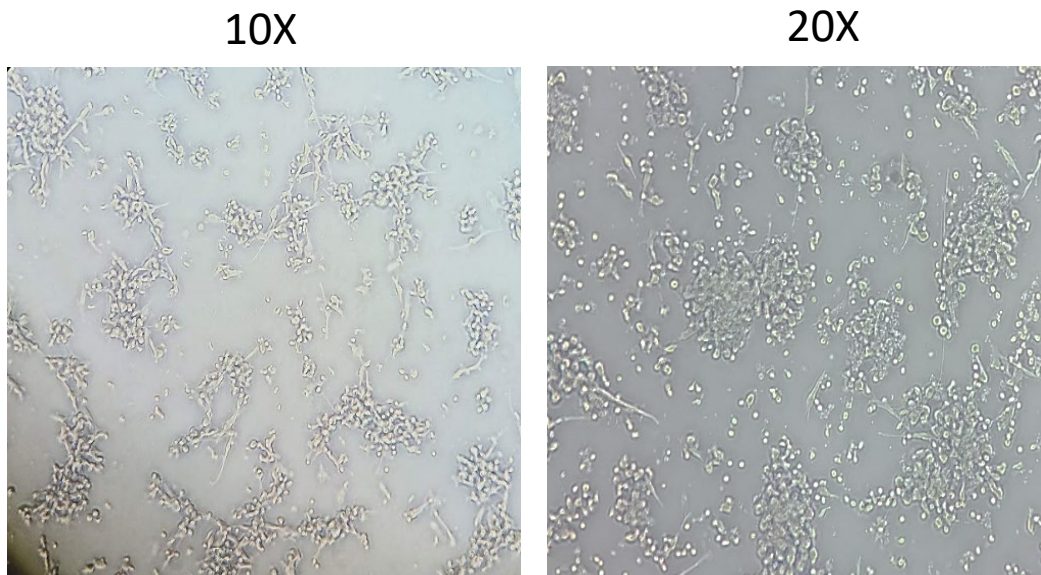
**Figura S4. Estrategia de análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo para la detección de LT CD8+ secretores de IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  ante restímulo con pools de péptidos.** PBMCs autólogas irradiadas y pulsadas o no con los pools de péptidos eran marcadas con CFSE y usadas como células presentadoras para estimular las células provenientes del cultivo. Estas dos poblaciones celulares eran cocultivadas por 6 horas para la presentación del antígeno y posterior secreción de citoquinas. Pasado dicho tiempo las células eran marcadas con *Zombie Violet* como marcador de viabilidad y posterior marcación de antígenos superficiales CD3 y CD8, y antígenos intracelulares IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Se determinó la población linfóide mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los LT CD8+ se estableció el porcentaje de células secretoras de las citoquinas evaluadas.



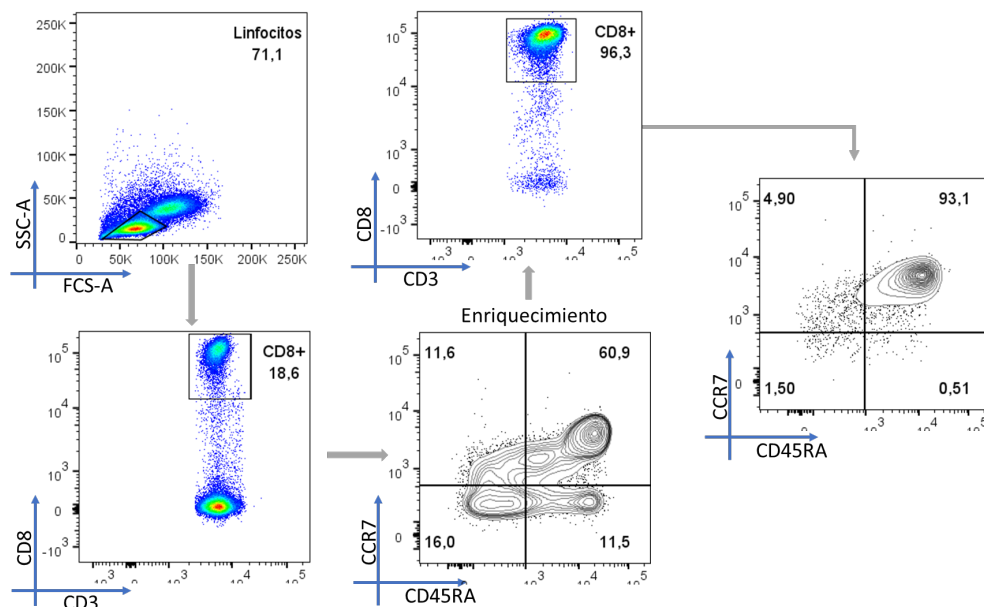
**Figura S5. Viabilidad de las células del donante 2 después de dos ronda de estimulación con el pool A2 vs el pool Neo 2.** Las células del donante 2 fueron recolectadas y estimuladas según el protocolo de citoquinas intracelulares. El análisis de citometría de flujo mediante el marcador Zombie Violet refleja la baja viabilidad de las células provenientes del cultivo con el pool A2 comparado con el pool Neo 2 (12,9% VS 96.3 %).



**Figura S6. Detección de LT CD8+ específicos a péptidos pertenecientes del pool Neo 1 y Neo 3 a partir de cultivo acDCs.** Los LT CD8+ del donante 2 provenientes del cultivo de acDCs estimulados con el pool Neo 1 y Neo 3 fueron marcados con tetrámeros cargados con cada uno los péptidos provenientes del pool.

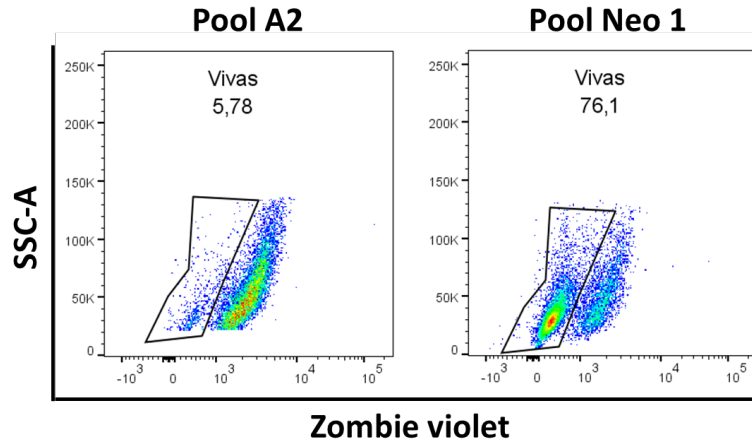


**Figura S7. Obtención de DCs in-situ y enriquecimiento de LT CD8 vírgenes a partir de PBMCs totales.** PBMCs fueron cultivados durante 24 horas en presencia de IL-4 (500U/mL) y GM-CSF (1000U/mL). Posteriormente se adicionó el coctel de maduración LPS (IFN- $\gamma$  y LPS) y pulsadas con los pools de péptidos durante 24 horas. Al finalizar las 48 horas se realizaron lavados con PBS con el fin de retirar las células no adherentes y se registró fotográficamente la morfología de las células en microscopio de contraste de fases en aumento de 10x (panel izquierdo) y 20x (panel derecho).

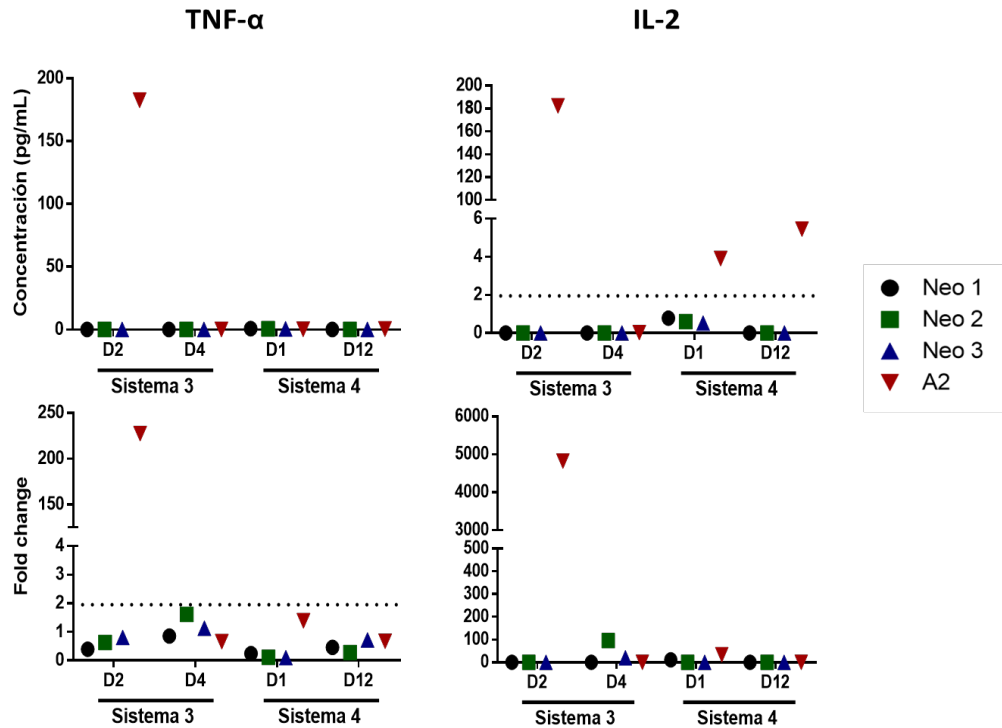


**Figura S8. Estrategia de “gating” de enriquecimiento de la fracción vírgen de LT CD8.** La pureza del enriquecimiento de la fracción naíve se midió antes y después de la separación magnética por selección negativa. Las cuatro subpoblaciones de memoria se definieron de la siguiente manera:

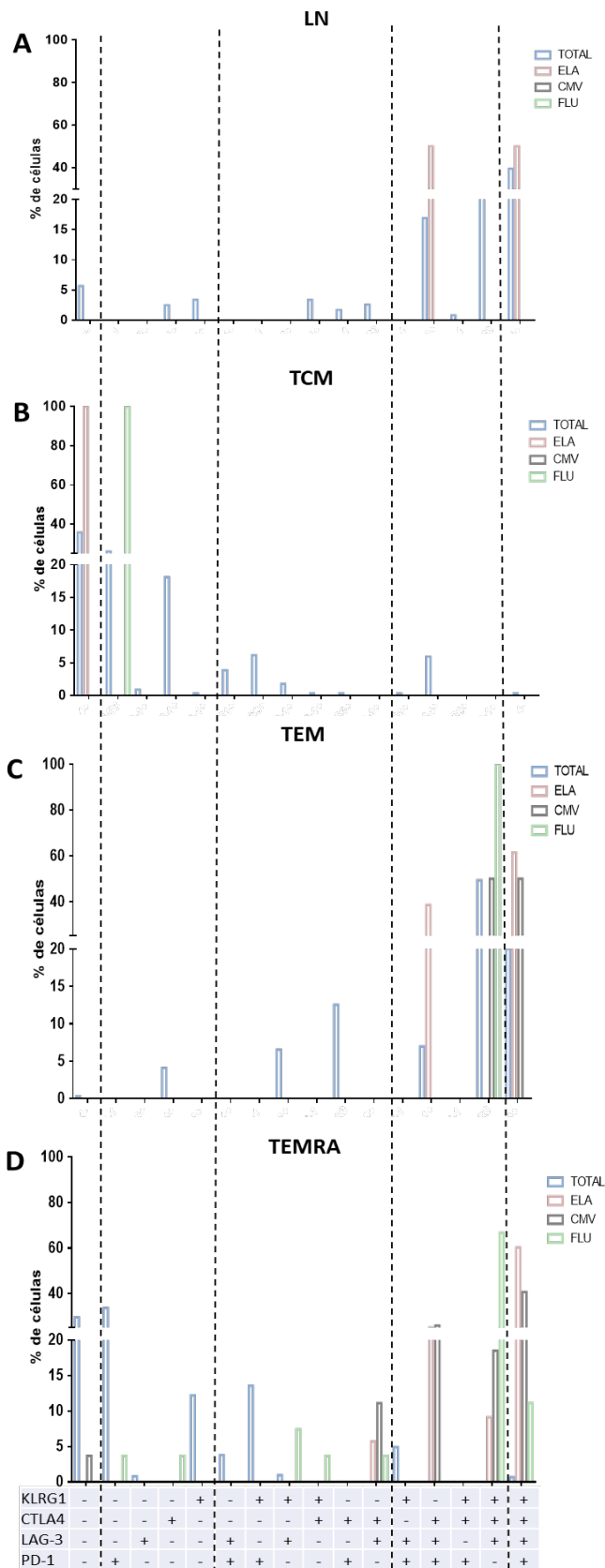
Virgenes (CD45RA+CCR7+); Memoria Central (CD45RA-CCR7+); Memoria Efectora (CD45RA-CCR7-); Terminalmente diferenciadas (CD45RA+CCR7-).



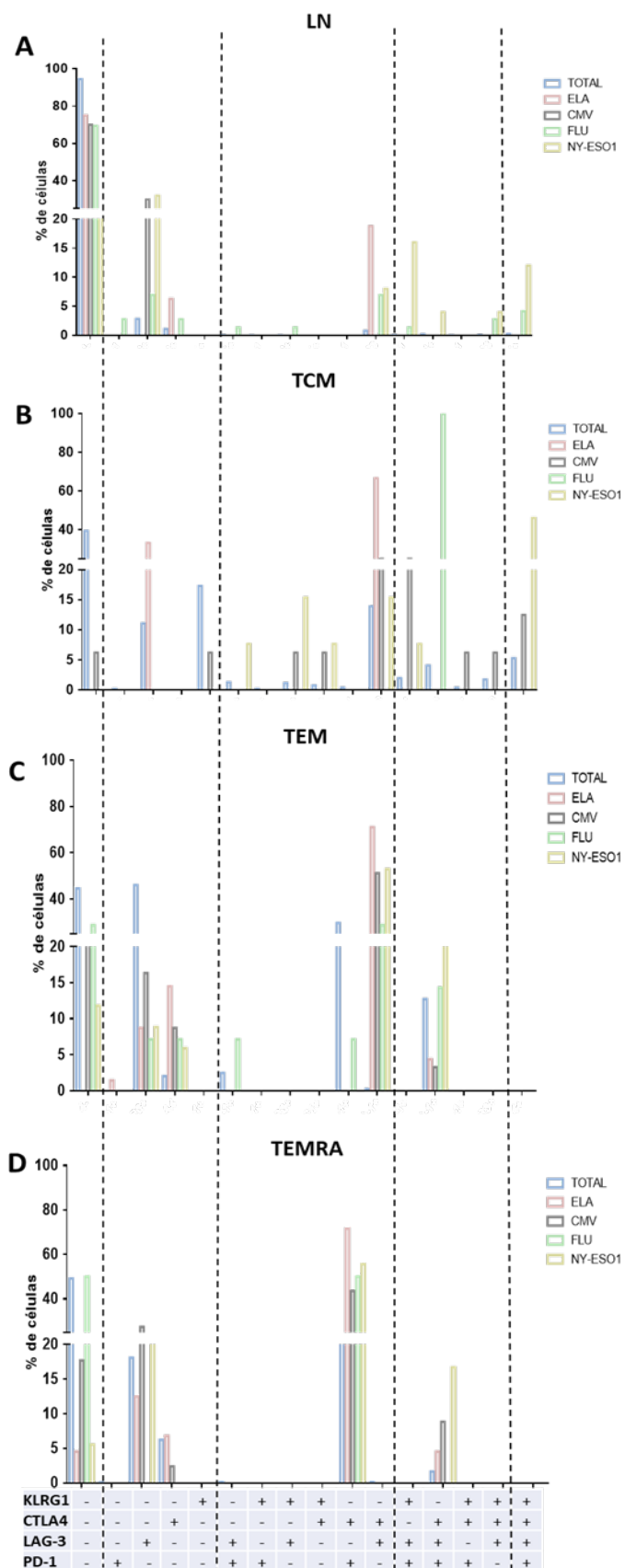
**Figura S9. Viabilidad de las células del donante 4 después de dos ronda de estimulación con el pool A2 vs el pool Neo 1.** Las células del donante 4 fueron recolectadas y estimuladas según el protocolo de citoquinas intracelulares. El análisis de citometría de flujo mediante el marcador Zombie Violet refleja la baja viabilidad de las células provenientes del cultivo con el pool A2 comparado con el pool Neo 1 (5,78% VS 76.1 %).



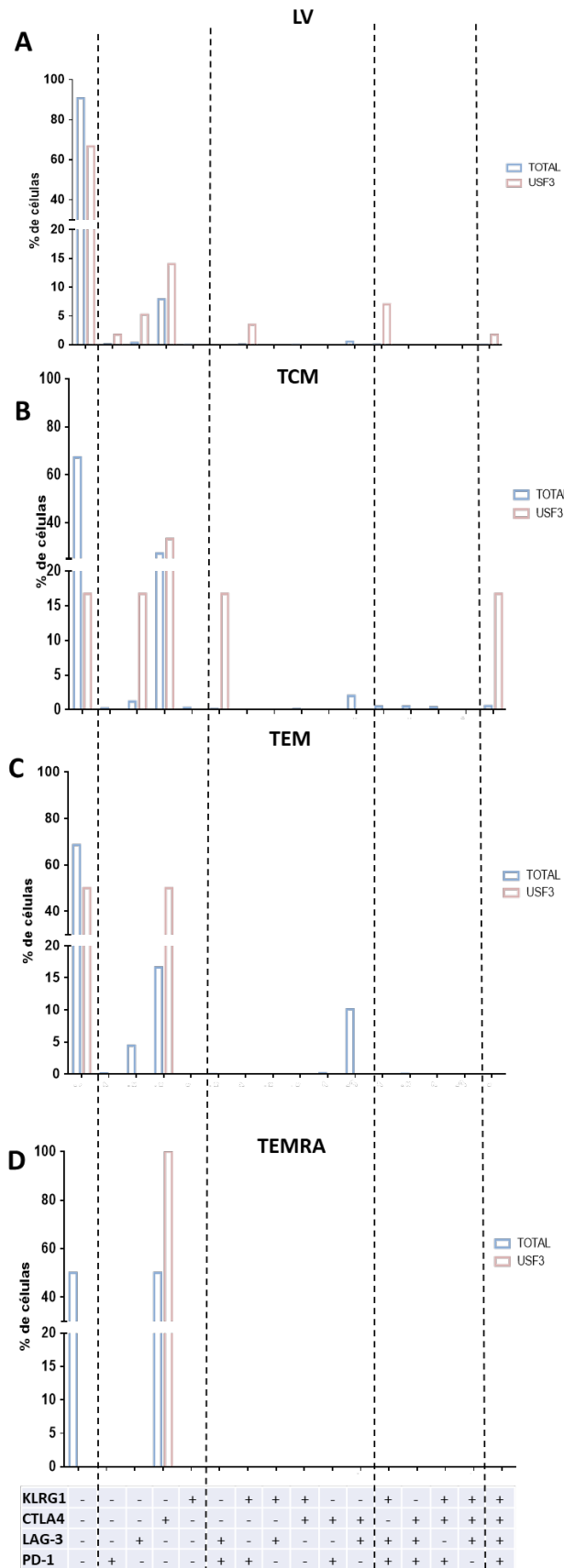
**Figura S10. Comparación de las concentración de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-2 secretadas durante la evaluación de respuesta en el ELISPOT de las células provenientes del sistema de cultivo 3 y 4.** Se determinó la concentración (pg/mL) de TNF- $\alpha$  e IL-2 mediante CBA del sobrenadante del ELISPOT de las células después de la primera ronda de estimulación con los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) (A). Se calculó el *Fold change* de la concentración con respecto a los valores obtenidos en el sobrenadantes de células sin estimular. La línea punteada se encuentra resaltando aquellos valores de citoquinas superaban un Fold change de 2 (B)



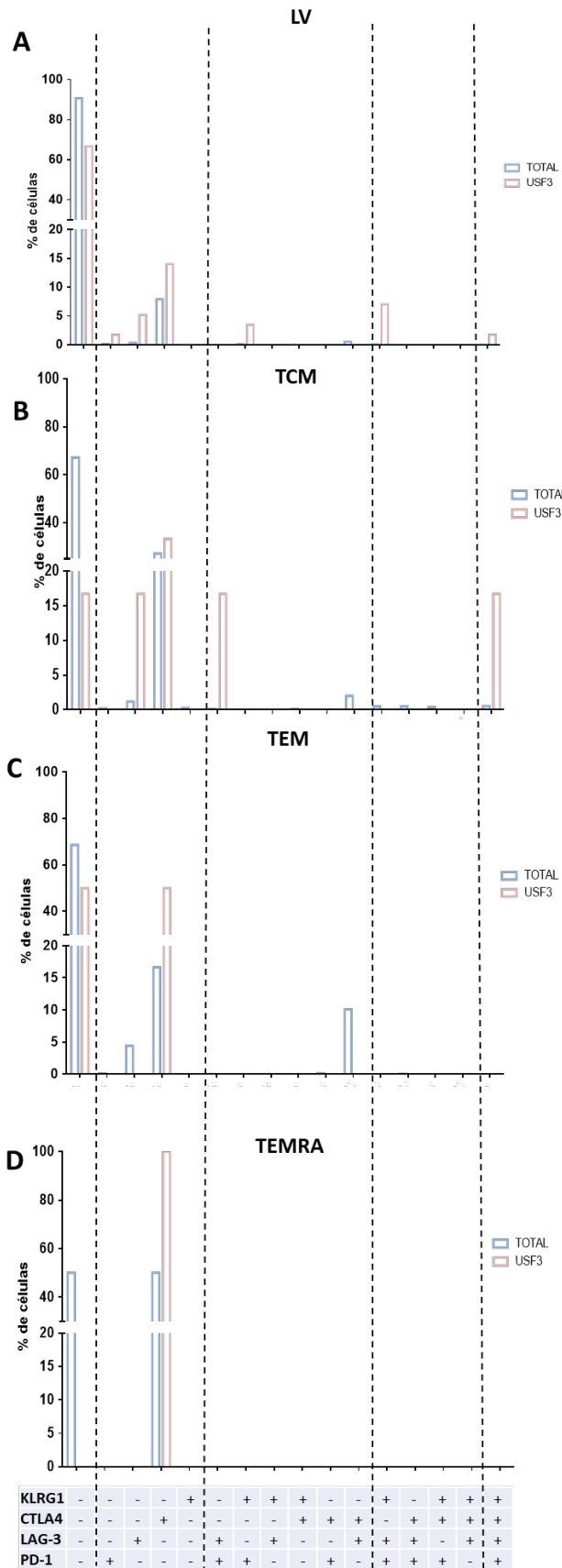
**Figura S11. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 2 mediante el tercer sistema de cultivo.** Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) en cada una de las subpoblaciones de memoria por medio de análisis booleanos de los gates positivos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. Gráfico de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 antígeno específicos en los linfocitos vírgenes (A), linfocitos de memoria central (B), linfocitos de memoria efectora (TEM) y linfocitos de memoria terminalmente diferenciados (D).



**Figura S12. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool A2 del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.** Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) en cada una de las subpoblaciones de memoria por medio de análisis boléanos de los gates póstos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. Gráfico de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 antígeno específicos en los linfocitos vírgenes (A), linfocitos de memoria central (B), linfocitos de memoria efectora (TEM) y linfocitos de memoria terminalmente diferenciados (D)



**Figura S13. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 1 mediante el cuarto sistema de cultivo.** Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) en cada una de las subpoblaciones de memoria por medio de análisis boléanos de los gates positivos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. Gráfico de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 USF3 específicos en los linfocitos vírgenes (A), linfocitos de memoria central (B), linfocitos de memoria efectora (TEM) y linfocitos de memoria terminalmente diferenciados (D).



**Figura S14. Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las distintas subpoblaciones de memoria de los linfocitos estimulados con el pool de neoantígenos del donante 12 mediante el cuarto sistema de cultivo.** Perfil de expresión de marcadores de agotamiento y senescencia (PD-1, LAG-3, CTLA-4, KLRG1) en cada una de las subpoblaciones de memoria por medio de análisis boléanos de los gates pósitos para cada uno de los marcadores mediante FlowJo. Gráfico de barras que representa la frecuencia (%) de todas las 15 combinaciones de los marcadores tanto en los LT CD8 totales como los LT CD8 USF3 específicos en los linfocitos vírgenes (A), linfocitos de memoria central (B), linfocitos de memoria efectora (TEM) y linfocitos de memoria terminalmente diferenciados (D).

## 14. Tablas suplementarias

**Tabla S1. Índices de fluorescencia para las tres concentraciones (50uM, 25uM y 6.25uM) de los 23 péptidos evaluados por el ensayo de afinidad por T2.** En negrilla se encuentran resaltados aquellos IF que son significativamente mayores al control negativo (MMG) ( $p < 0.05$ ).  $n=3$ , ANOVA de dos vías con comparación múltiple no pareada mediante la prueba de Dunnett.

IF	50 $\mu$ M	25 $\mu$ M	6,25 $\mu$ M
CMV (C+)	<b>3,347</b>	<b>2,858</b>	<b>1,283</b>
MMG (C-)	0,081	0,034	0,006
APC	<b>2,639</b>	1,071	0,480
DHX40b	1,026	0,614	0,406
NPM1	<b>3,026</b>	1,683	0,615
TGFBRII	<b>2,194</b>	1,447	0,559
USF3	0,070	0,070	0,101
KRAS MUT	0,805	0,756	0,317
KRAS WT	0,254	0,174	0,132
TP53 MUT	0,891	0,495	0,373
TP53 WT	0,634	0,384	0,230
CDK4 MUT	<b>3,632</b>	<b>3,090</b>	<b>1,890</b>
CDK4 WT	-0,092	-0,116	-0,069
ASTN1 MUT	0,717	0,350	0,050
ASTN1 WT	-0,007	-0,030	-0,007
CDC73 MUT	-0,052	-0,079	-0,042
CDC73 WT	0,274	0,023	0,016
EXOC8 MUT	<b>2,489</b>	1,005	0,789
EXOC8 WT	1,015	0,854	0,144
SEC2A MUT	1,038	1,113	0,566
SEC2A WT	2,441	1,672	0,757
POM121 MUT	<b>3,219</b>	<b>2,858</b>	<b>1,010</b>
POM121 WT	<b>2,427</b>	0,732	0,149



**Tabla S2. Descripción general de las unidades de sangre de donantes sanos HLA-A\*02:01.**

#	Donante	Edad	Sexo	A	A
1	LAND-000	26 años	Femenino	02:01:01G	01:01:01
2	LAND-001	30 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G
3	LAND-002	25 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G
4	LAND-003	23 años	Masculino	22:01:01G	02:01:01G
5	LAND-004	21 años	Femenino	02:01:01G	23:01:01G
6	LAND-005	30 años	Femenino	02:01:01G	32:01:01G
7	LAND-006	21 años	Femenino	02:01:01G	24:02:01G
8	LAND-010	20 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G
9	LAND-012	30 años	Masculino	02:01:01G	23:01:01G
10	LAND-013	24 años	Masculino	01:01:01G	02:01:01G
11	LAND-015	22 años	Femenino	02:01:01G	26:01:01G
12	LAND-017	27 años	Femenino	02:01:01G	33:01:01G
13	LAND-018	22 años	Femenino	01:01:01G	02:01:01G
14	LAND-019	20 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G
15	LAND-21	28 años	Masculino	02:01:01G	24:14:01G
16	LAND-22	36 años	Masculino	02:01:01G	32:01:01G
17	LAND-024	33 años	Femenino	02:01:01G	26:01:01G
18	LAND-25	25 años	Masculino	02:01:01G	31:01:02G

**Tabla S3. Concentración de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 secretadas por PBMCs estimuladas con el pool de A2 o los pools de neoantígenos.** Se determinó la concentración (pg/mL) de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 mediante CBA del sobrenadante de cultivos de PBMCs (re)estimulados alguno de los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) para los ocho donantes (A). Se calculó el *Fold change* de la concentración con respecto a los valores obtenidos en el sobrenadantes de células sin estimular, en negrilla se resaltan aquellos donantes cuyo valores de citoquinas superaban un *Fold change* de 2 (B).

A	IFN- $\gamma$						TNF- $\alpha$						IL-2					
	Donante	N1	N2	N3	A2	C+	Donante	N1	N2	N3	A2	C+	Donante	A2	N1	N2	N3	C+
Concentración (ug/mL)	D1	0	2,08	45,7	260	5159	D1	0	0	1,55	0	1777,2	D1	1,34	0,38	0,76	1,15	5616,8
	D2	0,92	0	0	8952	8364	D2	0	0	0,78	1177,1	7296,5	D2	364,62	0	0	0	4916,2
	D4	0	26,44	0	6575	8914	D4	0	1,51	9,82	16,4	6021,7	D4	15,11	0	0	0	16416,8
	D5	0	0	0	47,7	0	D5	0	1,32	0	63,5	5,30	D5	3,96	0	0,77	0,38	16,14
	D6	0	0	0	3493	3667	D6	0	0	0	9,05	1709,9	D6	2,35	0	0,96	0	1184,85
	D10	0	-	-	450	4138	D10	0	-	-	0	177,2	D10	1,37	0	-	-	1276,06
	D12	-	-	33,4	5379	6743	D12	-	-	4,27	14,5	2473,1	D12	0	-	-	1,76	1443,4
	D17	19,4	4,01	4,01	2750	1791	D17	0	0	0	7,13	182,4	D17	6,61	36,48	0	0	727,24
B	IFN- $\gamma$						TNF- $\alpha$						IL-2					
	Donante	N1	N2	N3	A2	C+	Donante	N1	N2	N3	A2	C+	Donante	N1	N2	N3	A2	C+
Fold Change	D1	0	1	<b>4</b>	<b>17,65</b>	330	D1	0	0	1,5	0	1777	D1	1	0,1	1,1	1,1	735
	D2	1	0,5	0,92	<b>184</b>	170	D2	0	0	1,14	<b>215</b>	1327	D2	0,86	1	1	<b>37,5</b>	493
	D4	0,44	1,6	0,17	<b>147,6</b>	200	D4	0	1,9	<b>7,3</b>	11,5	3860	D4	1	0,8	1,13	<b>2,7</b>	1866
	D5	0	-	-	0	0	D5	1,5	0	0	5,3	0	D5	1	1,1	-	1,5	3
	D6	0	1	1	<b>10</b>	2380	D6	0	0,76	0,5	10	1711	D6	1	1,1	1	1,1	145
	D10	1	-	-	<b>6,88</b>	55	D10	0,75	-	-	0	28,8	D10	1	-	-	1,1	149
	D12	-	-	1,34	<b>56</b>	70	D12	-	-	1,3	<b>2,1</b>	187	D12	-	-	1,2	1	172
	D17	<b>2</b>	1,2	1	<b>140</b>	91	D17	0	0	0	7	182	D17	<b>4,65</b>	1	1	1,65	74

**Tabla S4. Comparación de la frecuencia (%) de LT CD8 productores de las citoquinas intracelulares IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  según el sistema de cultivo. (A) % de LT CD8 IFN- $\gamma$ +, % LTCD8+TNF- $\alpha$ + y %LT CD8+IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ + mediante la marcación de citoquinas intracelulares en las células del cultivo después de la segunda ronda de estimulación con los pools de antígenos (A2, Neo1, Neo2, Neo3) (B) *Fold change* del % CD8+ con respecto a los valores obtenidos en las células sin estimular. Los puntajes resaltados en negrilla identifican el % LT CD8 secretores de citoquinas que superaban un *Fold change* de 2 y un % absoluto >0,2. Sistema 2 en verde, sistema 3 en amarillo y sistema 4 en azul.**

		%CD8					<i>Fold Change</i>		
A	Donante	POOL A2			B	Donante	POOL A2		
		IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +			IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +
	D2 (1R)	4,91	0,022	3,26		D2 (1R)	<b>4,21</b>	1,71	<b>8,41</b>
	D2 (2R)	0,76	0,5	0,17		D2 (2R)	1,54	1,00	1,00
	D12	11,41	0,19	6,8		D12	<b>22,45</b>	1,54	<b>32,90</b>
	D2	1,64	0	5,39		D2	1,62	0,56	<b>3,63</b>
	D4	0	9,41	3,12		D4	0,00	<b>11,57</b>	1,00
	D1	0	1,73	2,05		D1	0,53	<b>2,35</b>	<b>8,88</b>
	D12	0	2,34	8,34		D12	<b>8,00</b>	<b>5,59</b>	<b>93,67</b>
	POOL NEO 1								
	Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +		Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +
	D2 (1R)	0,11	0,016	0		D2 (1R)	1,65	1,29	0
	D2 (2R)	0	0,42	0,25		D2 (2R)	0,47	<b>2,11</b>	<b>2,14</b>
	D12	0	0	0,46		D12	0,62	0,50	<b>3,71</b>
	D2	0	2,19	0,5		D2	0,66	<b>3,28</b>	<b>2,67</b>
	D4	0,062	0,119	0		D4	1,63	1,18	0,00
	D1	0	0,08	0,071		D1	0,33	1,18	<b>4,94</b>
	D12	0	0	0,031		D12	0,38	0,86	1,00
	POOL NEO 2								
	Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +		Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +
	D2 (1R)	0,03	0	0		D2 (1R)	1,18	0,00	0,60
	D2 (2R)	5,05	0,89	2,27		D2 (2R)	<b>3,81</b>	3,34	11,32
	D12	0	0	1,09		D12	0,51	0,18	7,41
	D2	0	1,33	0,27		D2	0,49	2,39	1,90
	D4	0	0,062	0,004		D4	<b>0,43</b>	<b>6,64</b>	1,36
	D1	0	0,1	0,172		D1	0,72	1,22	<b>10,56</b>
	D12	0,09	0,17	0,35		D12	1,31	1,59	<b>19,44</b>
	POOL NEO 3								
	Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +		Donante	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ +
	D2 (1R)	0,00	0,12	-0,06		D2 (1R)	0,34	3,09	0,00
	D2 (2R)	0,00	0,08	0,14		D2 (2R)	0,68	1,21	1,64
	D12	0,28	0,00	0,71		D12	1,19	0,36	<b>5,18</b>
	D2	0,00	1,77	0,40		D2	0,32	2,84	2,33
	D4	0,00	0,15	0,00		D4	0,38	<b>2,36</b>	1,09
	D1	0,00	0,09	0,12		D1	0,15	1,20	<b>7,78</b>
	D12	0,00	0,16	0,12		D12	0,97	1,55	<b>6,67</b>

**Tabla S5: Interacciones entre P1 y P2 en la versión WT de ASTN1**

#	P1	P2	Contact score
	Atom	Atom	
1	C	N	1
2	O	N	1
3	CA	N	1
4	C	CA	1
5	O	CA	0,997
6	C	C	0,979
7	C	O	0,95
8	O	C	0,946
9	N	N	0,943
10	CB	N	0,846
11	O	O	0,807
12	C	CB	0,78
13	CA	CA	0,698
14	CG	N	0,34
15	O	CB	0,257
16	C	CG	0,251
17	CA	O	0,228
18	CA	C	0,099

19	CB	O	0,08
20	O	CG	0,056
21	N	CA	0,034
22	CB	CA	0,024
23	CA	CB	0,012
<b>Accumulated contact score</b>			<b>13,33</b>

**Tabla S6: Interacciones entre P1 y P2 en el neoantígeno ASTN1**

#	P1	P2	Contact score
	Atom	Atom	
1	C	N	1
2	O	N	1
3	C	CA	0,999
4	C	CD	0,999
5	CA	N	0,999
6	O	CA	0,997
7	CA	CD	0,992
8	C	C	0,99
9	O	C	0,985
10	C	O	0,962
11	O	O	0,925

12	O	CD	0,895
13	N	N	0,887
14	CB	N	0,87
15	C	CG	0,852
16	C	CB	0,841
17	CA	CA	0,678
18	N	CD	0,581
19	CG	O	0,496
20	CA	O	0,416
21	CB	CD	0,403
22	CG	N	0,393
23	CB	O	0,275
24	O	CB	0,242
25	CA	C	0,18
26	CA	CG	0,101
27	O	CG	0,081
28	CB	CA	0,041
29	CB	C	0,031
30	CA	CB	0,019
31	N	CA	0,014
<b>Accumulated contact score</b>			<b>19,14</b>

**Tabla S7: Interacciones entre P2 y P3 en la versión WT de ASTN1**

#	P2	P3	Contact score
	Atom	Atom	
1	C	N	1
2	O	N	1
3	CA	N	1
4	C	CA	0,999
5	O	CA	0,997
6	C	C	0,983
7	CB	N	0,982
8	O	C	0,975
9	C	O	0,895
10	N	N	0,834
11	O	O	0,812
12	C	CB	0,771
13	CA	CA	0,685
14	O	CB	0,219
15	CB	O	0,144
16	CG	N	0,124
17	CB	CA	0,1

18	CA	O	0,073
19	CA	C	0,072
20	CB	C	0,026
21	CA	CB	0,013
22	N	CA	0,011
<b>Accumulated contact score</b>			<b>11,72</b>

**Tabla S8: Interacciones entre P2 y P3 en el neoantígeno de ASTN1**

#	P2	P3	Contact score
	Atom	Atom	
1	C	N	1
2	O	N	1
3	C	CA	0,999
4	CA	N	0,999
5	O	CA	0,997
6	C	C	0,977
7	O	C	0,953
8	CB	N	0,95
9	N	N	0,836
10	C	CB	0,826
11	O	O	0,716

12	C	O	0,712
13	CA	CA	0,677
14	O	CB	0,464
15	C	CG	0,333
16	CA	C	0,059
17	CG	N	0,055
18	CB	CA	0,046
19	CD	N	0,029
20	CA	CB	0,027
21	N	CA	0,012
<b>Accumulated contact score</b>			<b>12,67</b>