

# ANTÍGENOS TUMORALES Y DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA EL CÁNCER UTILIZANDO PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS

Alberto Monroy García  
Jorge Hernández Montes  
María de Lourdes Mora García

## RESUMEN

Menos de medio centenar de genes que codifican para antígenos asociados a tumores malignos en humanos han sido identificados hasta nuestros días. Los antígenos tumorales se dividen en aquellos que son reconocidos ya sea por linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>: antígenos testiculares o compartidos; antígenos de diferenciación y antígenos tumorales mutados, o por los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>. La aplicación clínica en fase I y II de vacunas basadas en péptidos antigénicos derivados de antígenos como HER-2/neu, HPV16-E7, PSMA, CEA, MUC-1, K-ras y H-ras, han mostrado tener la capacidad de estimular la respuesta inmune celular en pacientes con diferentes tipos de cáncer avanzado. A pesar de que su aplicación clínica en el tratamiento del cáncer no ha sido suficiente para erradicar a los tumores en la mayoría de los casos, existen evidencias de que su aplicación en vacunas profilácticas puede ser una mejor estrategia contra el desarrollo de tumores cancerosos.

**Palabras Clave:** Antígenos tumorales, péptidos antigénicos, inmunoterapia del cáncer.

## Tumour antigens and vaccine development against cancer using antigenic peptides

## ABSTRACT

Less than fifty human tumor-associated antigen codifying genes, have been identified until now. Tumor antigens are divided in either those recognized by cytotoxic T lymphocytes, CD8<sup>+</sup>: tumor-specific shared antigens or testis cancer antigens; differentiation antigens and mutated antigens, or those recognized by helper T lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Phase I and II clinical trials, using vaccines based in antigenic peptides derived from HER-2/neu, HPV16-E7, PSMA, CEA, MUC-1, K-ras and H-ras proteins, have shown that these antigens are able to induce cellular immune responses in patients with different types of advanced tumors. In spite of, their therapeutic clinical use in these patients was not able to eliminate tumors in the majority of these cases, some evidences indicate that the application of these antigens as prophylactic vaccines, can be a better strategy against the development of malignant tumors.

**Key Words:** Tumor antigens, antigenic peptides, cancer immunotherapy.

ARTÍCULO RECIBIDO EN ABRIL DEL 2003 Y ACEPTADO EN MAYO DEL 2003.

## INTRODUCCIÓN

La generación de tumores en animales y la transformación neoplásica (cancerosa) de células cultivadas, puede ser inducida experimentalmente por agentes biológicos, químicos y físicos bien caracterizados denominados carcinógenos<sup>1</sup>. Algunos agentes carcinógenos conocidos, son también causantes naturales de cáncer en humanos y animales. Por ejemplo, los retrovirus oncogénicos constituidos por ARN, son agentes etiológicos de varios tipos de cáncer originados espontáneamente en varias especies de animales, incluyendo primates, otros

mamíferos, aves y reptiles<sup>2</sup>. Otro factor biológico bien caracterizado es el patógeno bacteriano *Helicobacter pylori*, el cual se asocia etiológicamente como causa común de úlcera gástrica, además se considera como el factor principal de cáncer gástrico en humanos<sup>3</sup>. La carcinogénesis química inducida por los productos del humo del tabaco es una causa común de cáncer pulmonar<sup>4</sup>. Asimismo, la carcinogénesis física provocada por radiaciones ionizantes posee un amplio potencial para generar diferentes tipos de cáncer; mientras que la provocada por las radiaciones ultravioleta, se asocia fuertemente con el desarrollo de cáncer de piel<sup>5</sup>. Se ha estimado que tan sólo el 20% de los tumores es causado por factores biológicos infecciosos: 15% inducidos por virus y 5% por bacterias y parásitos. El restante

---

Laboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. E-mail: albertomon@yahoo.com.

80% se considera que tiene su asociación con agentes físicos y químicos.

Como en muchas otras enfermedades, los factores genéticos y ambientales están implicados en la etiología del cáncer en humanos. No obstante, las causas específicas de muchos tipos de cáncer comunes en el humano como son: el cáncer de mama, colon, recto, nódulos linfáticos, vejiga, páncreas, médula ósea, estómago y muchos más, resultan aún desconocidas<sup>1-2</sup>. No obstante, en los últimos años, con ayuda de la tecnología moderna, se han realizado grandes esfuerzos para identificar a las estructuras moleculares propias de las células tumorales (antígenos), con la finalidad de utilizarlas como blancos potenciales en la generación de respuesta inmune específica (inmunógenos) en el organismo huésped y de esta forma eliminar a los tumores. En el presente escrito, se expone una revisión de los diferentes grupos de antígenos tumorales identificados hasta ahora; la forma en que las células del sistema inmune los reconocen; y algunos de los resultados obtenidos en la aplicación clínica de péptidos inmunogénicos usados en la inmunoterapia de pacientes con diferentes tumores avanzados, remarcando los pros y contras de este tipo de terapia.

#### ESTRUCTURAS VIRALES, ONCOGENES Y PROTO-ONCOGENES, COMO ANTÍGENOS POTENCIALES DEL CÁNCER

Los virus oncogénicos que pueden producir tumores en animales (mamíferos, aves, y otros vertebrados) o llevar a las células normales cultivadas hacia un estado neoplásico (tumoral), comprenden a los virus constituidos por ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN)<sup>2</sup>.

Los virus oncogénicos constituidos por ADN (virus-ADN) incluyen algunos miembros de 5 de 6 familias: papovavirus (Ej. virus del papiloma), hepadnavirus (Ej. hepatitis-B), adenovirus (Ej. adenovirus humano tipos 3, 4 y 7), herpesvirus (Ej. Epstein-Barr), y Poxvirus (Ej. Virus de vaccinia) (Tabla 1). En general, la infección de células con un virus-ADN puede resultar en una infección lítica productiva con muerte celular y liberación de nuevos virus, o en la transformación celular hacia el estado neoplásico, con poca o nula producción del virus pero con integración de la información genética del virus en el ADN de la célula huésped<sup>2,6</sup>.

Varios tipos de cáncer humano han sido asociados etiológicamente con infecciones de virus-ADN. El virus de Epstein-Barr (EBV), un tipo de virus de herpes causa mononucleosis infecciosa, puede ser involucrado como causa de linfoma de Burkitt en África principalmente y también en algunos casos se asocia con el desarrollo de carcinoma nasofaríngeo. El virus de la hepatitis-B (HBV), tiene un papel causal en el carcinoma hepatocelular, una de las formas más comunes de cáncer en Asia y a nivel mundial, asimismo el virus de la hepatitis-C (HCV) también se encuentra asociado al cáncer hepático. Un nuevo virus de la familia de los Herpes, inicialmente descrito en 1994 y actualmente designado como KSHV (virus

herpes asociado con sarcoma de Kaposi), está implicado como un candidato etiológico en el sarcoma de Kaposi y linfoma asociado con SIDA<sup>2,7</sup>. Algunos tipos de virus del papiloma humano (HPV), HPV-16 y 18 principalmente, se asocian con lesiones precursoras de carcinoma escamoso del cérvix uterino. En muchos de los casos estudiados, el ADN viral es integrado en las células cancerosas, pero agentes o factores adicionales pueden estar involucrados en los diferentes estadios de progresión hacia carcinoma invasor<sup>8</sup>.

Por otro lado, de los virus oncogénicos constituidos por ARN (virus-ARN), sólo algunos miembros de la familia de los retrovirus son capaces de inducir tumores en animales y transformar células cultivadas. Estos virus-ARN asociados a tumores, son clasificados de acuerdo a sus huéspedes naturales, tales como aves, ratones, felinos, primates, humanos y también de acuerdo con el tipo de tumor que se genera en ellos, leucemia ó sarcoma. Sólo dos tipos de retrovirus se asocian con tumores en humanos: el virus de la leucemia de células T (HTLV) tipo 1 y 2, que se asocia etiológicamente con leucemias humanas; y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), un miembro de la subfamilia de los lentivirus y agente causal de SIDA, predispone a infecciones oportunistas, incluyendo KSHV o HPV<sup>2</sup>.

Por otro lado, muchos retrovirus oncogénicos, tienen otros genes conocidos como genes transformantes u **oncogenes**, se les conoce como *v-**onc*** y comúnmente son identificados por un código de tres letras (Tabla 1). Bajo la influencia de una secuencia promotora viral, el gene *v-**onc*** es transcrito junto con otros genes virales y se convierte en el responsable de la transformación neoplásica de la célula. Todos los retrovirus transformantes poseen uno, o raramente dos de los oncogenes, de los cuales más de 20 han sido caracterizados<sup>2,9</sup> (Tabla 1). La presencia de secuencias oncogénicas en el genoma de todas las células normales de los vertebrados, ha permitido postular la “teoría del oncogene”, en donde se estipula que los oncogenes retrovirales o sus precursores (protovirus) derivan de genes celulares normales<sup>1</sup>. Estos genes homólogos a los genes *v-**onc***, en las células huésped normales se les llama *c-**onc*** o **proto-oncogenes**. Los proto-oncogenes poseen intrones y exones, mientras que los oncogenes de retrovirus no tienen intrones. La teoría del oncogene también presupone que la expresión aumentada de los proto-oncogenes (activación) o una inapropiada expresión de formas mutadas de estos genes, ocurriendo de manera espontánea ó inducida por agentes causantes de cáncer, contribuye a la transformación neoplásica y al subsecuente desarrollo del cáncer<sup>1-2</sup>. Esta teoría ha sido actualmente reconocida, por el hecho de que diversas investigaciones convergen en que mutaciones o inapropiadas expresiones de genes celulares tales como genes supresores, oncogenes, genes de reparación de nucleótidos de ADN y genes que median la muerte celular programada (apoptosis), están involucrados en alguna de las diversas etapas que conducen al desarrollo de cáncer en humanos. Por ejemplo, se ha visto que la activación de los proto-oncogenes en las células somáticas conducen a muchas formas de cáncer, incluyendo carcinoma, sarcoma, leucemias y linfomas; y que los

VERTIENTES

A) Tipos virales asociados con el desarrollo de cáncer.				
Tipo de virus	Familia	Virus asociado a cáncer		
ADN	Adenovirus	Adenovirus Humano (tipos 3, 4 y 7)		
	Herpesvirus	Virus Epstein-Barr, Virus Herpes asociado con Sarcoma de Kaposi		
	Poxvirus	Virus Vaccinia		
	Papovavirus	Virus de Papiloma Humano (HPV)		
ARN	Hepadnavirus	Virus de Hepatitis B		
	Retrovirus	Virus de Leucemia de linfocitos T		
		Virus de Inmunodeficiencia Humana		
B) Oncogenes retrovirales (lista parcial).				
Oncogenes (v-onc)	Prototipo Retroviral		Especies de origen	
src	Virus de sarcoma de Rous		Pollo	
myc	Virus de lielocitomatosis de ave		Pollo	
erb A, erb B	Virus de eritroblastosis de ave		Pollo	
myb	Virus de mieloblastosis de ave		Pollo	
H-ras	Virus Harvey de sarcoma de rata		Rata	
K-ras	Virus Kirsten de sarcoma de ratón		Ratón	
abl	Virus Abelson de leucemia de ratón		Ratón	
fes	Virus de sarcoma Felino		Gato	
sis	Virus de sarcoma de Simio		Mono	
C) Activación de proto-oncogenes celulares en cáncer humano.				
Proto-oncogene	Localización	Activado por	Cambio cromosomal	Tipo de cáncer asociado
c-myc	Núcleo	Rearreglo genético	Translocaciones: 8-14, 8-2, y 8-22	Linfoma de Burkitt
c-abl	Citoplasma	Rearreglo genético	Translocación: 9-22	Leucemia mieloide crónica
c-H-ras	Citoplasma	Mutación puntual		Carcinoma de vejiga
c-K-ras	Citoplasma	Mutación puntual		Carcinoma de pulmón y colon
N-myc	Núcleo	Amplificación genética		Neuroblastoma

Tabla 1. Virus, oncogenes y proto-oncogenes asociados con el desarrollo de tumores malignos<sup>2</sup>.

principales mecanismos de activación son: translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales y amplificaciones de genes<sup>7,9</sup> (Tabla 1). Asimismo, muchas de las proteínas codificadas por proto-oncogenes están involucradas en las vías de señalización del crecimiento celular y de la transmisión de señales hacia el núcleo para la activación de ciertos genes nucleares, que culminan en la síntesis de ADN, desregulación de la división celular y la transformación neoplásica<sup>1,9,10</sup> (Tabla 2). Por lo que, la sobre-producción de las proteínas codificadas por los oncogenes virales y la de los proto-oncogenes celulares pueden ser blancos antigénicos potenciales de las células tumorales.

**RESPUESTA INMUNE CONTRA TUMORES**

En los últimos años, la Inmunología tumoral, ha tenido gran importancia gracias al estudio y caracterización de los antígenos de rechazo tumoral, el cual tiene como base dos objetivos

fundamentales: primero, la identificación de los genes mutados (oncogenes y proto-oncogenes) que codifican para proteínas reguladoras y estructurales en diferentes tipos de cáncer, y que constituyen a los blancos con potencial antigénico en el rechazo tumoral, llamados también **antígenos asociados al tumor** (AAT); y segundo, el estudio del papel de la respuesta inmune en la detección y eliminación de células tumorales a través del reconocimiento de estos AAT, con la finalidad de generar vacunas específicas contra tumores<sup>11-13</sup>.

Los AAT pueden ser expresados intactos en la superficie de las células tumorales, o pueden ser presentados como fragmentos de proteínas (péptidos) unidos en los receptáculos de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) Clase I o II (ver adelante). Los AAT dispuestos sobre la superficie de las células tumorales se convierten en blancos de la respuesta inmune mediada por anticuerpos (respuesta humoral), y los

antígenos tumorales asociados con moléculas MHC son blancos de la respuesta mediada por linfocitos T (respuesta celular)<sup>6-7,14</sup>.

### RESPUESTA HUMORAL CONTRA AAT

Los anticuerpos son importantes en el reconocimiento de moléculas expresadas de manera anormal en la superficie de las células tumorales. La unión de los anticuerpos a estos antígenos puede favorecer la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en donde las células asesinas naturales pueden participar en la destrucción de las células tumorales; asimismo, los anticuerpos a través de la fijación de moléculas del sistema de complemento, también pueden participar en la destrucción de las células tumorales<sup>6-7</sup>. Por otro lado, se ha observado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra AAT generalmente tienen reacción cruzada con antígenos expuestos sobre células normales. No obstante, estos antígenos se expresan con mayor abundancia en las células tumorales que en las células normales. Pocos AAT reconocidos por anticuerpos han sido descubiertos y la mayoría de estos antígenos son glicoproteínas y glicolípidos. Tres de ellos son gangliósidos, una glicoproteína ácida expresada en la superficie de melanomas, gliomas y otros tumores de origen neuroectodérmico, además de grupos de carbohidratos<sup>7,15</sup> (Tabla 3).

### RESPUESTA CELULAR CONTRA AAT

La respuesta inmune celular contra tumores y células infectadas con virus requiere de la activación de los linfocitos T, lo cual depende fuertemente de la manera en que los antígenos son procesados en el interior de la célula blanco y presentados en su membrana. Por ejemplo, las células infectadas con virus o células tumorales que contienen proteínas virales o mutadas sintetizadas

en el citosol, son reconocidas y eliminadas por linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (LTCs) a través de gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (perforinas y granzimas) que liberan después de su activación; mientras que los antígenos que residen en los compartimientos vesiculares son detectados por los receptores de los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, los cuales al activarse liberan citocinas importantes para la activación de los LTCs y la diferenciación de los linfocitos B. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> detectan péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC clase I, mientras que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> detectan a los péptidos presentados por moléculas MHC clase II<sup>6-7,14</sup>.

Las moléculas MHC son glicoproteínas que se expresan en la membrana celular y son el producto de un conjunto de genes altamente polimórficos, los cuales se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano<sup>16</sup>; esta región ha sido denominada HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos), por haber sido inicialmente encontrada en los leucocitos humanos<sup>17</sup>.

Las moléculas MHC-I consisten de una cadena polipeptídica pesada de un peso molecular de 45,000 daltones (Da); unida no covalentemente a un pequeño péptido con un peso molecular de 12,000 Da; y que es conocido como  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ). La parte más larga de la cadena pesada se encuentra organizada en tres dominios globulares, a los cuales se les denomina  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , los cuales sobresalen de la superficie de la célula. Anclando a la molécula en la membrana citoplasmática se encuentra una pequeña sección hidrofóbica, y cercana a ella se encuentra una corta secuencia hidrofílica, que lleva el extremo carboxilo terminal hacia el citoplasma. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presentan una estructura compuesta de dos  $\alpha$ -hélices extendidas, sobrepuestas sobre

Alteración	Función de la proteína	Tipo e tumor
<b>Mutaciones puntuales</b> ERB2 FMS Ras p53 RB1	Receptor de Factor de Crecimiento Receptor de Factor estimulador de colonias Proteína de unión a GTP Control del ciclo celular, supresor tumoral Control del ciclo celular, supresor tumoral	Carcinoma de mama LMA, mielodisplasia Carcinomas y otros Vejiga, colon, pulmón y otros Retinoblastoma, osteosarcoma, carcinoma de páncreas
<b>Translocaciones cromosómicas</b> BCR-ABL EZA-PRL H4-RET TPR-MET LMYC-RLF NPM/ALK	Tirosina Cinasa (TC) Factor de transcripción Receptor de factor de crecimiento/ TC Receptor de factor de crecimiento/TC Factor de transcripción TC	LMC, LLA LLA de prelinfocitos-B Carcinoma de tiroides Carcinoma gástrico Carcinoma de pulmón Linfoma
<b>Deleciones y mutaciones</b> ERB-B	Receptor de factor de crecimiento	Gliomas

Tabla 2. Alteraciones genéticas de secuencias protéicas en tumores humanos<sup>7</sup>. LMA, leucemia monolítica aguda; LMC, leucemia monolítica crónica; LLA, leucemia linfocítica aguda.

VERTIENTES

Antígeno	Tipo de tumor	Tipo de antígeno	Distribución en tejido normal
<b>Idiotipos del receptor de linfocitos T y de Inmunoglobulinas</b>	Leucemias y linfomas de linfocitos T y B	Específicos del tumor	Ninguna
<b>Antígenos de diferenciación oncofetal</b> Antígeno carcinoembrionario (CEA)  $\alpha$ -fetoproteína (AFP)	Carcinoma de colon y otros Carcinoma de hígado	Propio de carcinomas Específico del tumor	Alta expresión en intestino fetal y baja en tejido adulto Hígado fetal, bajo en tejido normal adulto
<b>Antígenos de diferenciación (AD)</b> Antígeno común de leucemia linfoblástica aguda (CALLA) Antígeno epitelial 17-1A	Leucemia linfoblástica aguda Carcinoma de colon	Específico del tumor Asociado al tumor	Subserie de linfocitos T inmaduros Colon y otros epitelios normales
<b>Antígenos alterados de diferenciación</b> Mucina (MUC-1) Mucina epitelial polimórfica	Carcinoma de mama y otros	Propio de carcinomas	Algunos epítopes se expresan igual en tejidos tumorales y normales p ej. mamas lactando
<b>Sobre-expresión de AD</b> Antígeno prostático específico (PSA)  Fosfatasa alcalina placentaria  Antígeno asociado a carcinoma urinario Antígeno gp72 Antígeno gp75 Antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma	Carcinoma de próstata Seminoma/tumor de ovario Carcinoma de vejiga Carcinoma colorectal Melanoma Melanoma	Específico del tumor Asociado al tumor Asociado al tumor Asociado al tumor Asociado al tumor	Bajo en próstata normal  En placenta  Bajo en vejiga Bajo en epitelios del colon - -
<b>Otros</b> Grupos sanguíneos (T, Tn, Sialosil Tn) Gangliósidoa (GM2, GD2)  Gangliósidoa (9-0-Ac GD3)	Carcinoma  Melanoma/sarcoma/neuroblastoma Glioblastoma	Grupos sanguíneos Asociados al tumor Asociados al tumor	En eritrocitos  En algunos tejidos normales  En algunos tejidos normales

Tabla 3. Antígenos identificados por anticuerpos monoclonales<sup>7,15</sup>.

una base compuesta por láminas  $\beta$ -plegadas entrecruzadas entre sí, formándose con ello una pequeña cavidad en donde se aloja el péptido antigénico derivado del procesamiento endógeno<sup>18-19</sup> (Figura 1). Los AAT sintetizados en el citosol de la célula tumoral, son fragmentados mediante un complejo multicatalítico denominado proteasoma, constituido por proteínas de bajo peso molecular (LMPs) que tienen función proteolítica. Las principales proteínas proteolíticas del proteasoma son: LMP2, 7 y 10 y participan en la producción de péptidos antigénicos que se unirán a las moléculas MHC clase I<sup>20</sup>. Estos péptidos son transportados hacia el lumen del retículo

endoplásmico (RE) mediante un par de proteínas transportadoras denominadas TAP1 y TAP2 dispuestas en la membrana del RE<sup>21</sup>. En el RE la cadena  $\alpha$  de las moléculas MHC clase I, se encuentra protegida y estabilizada por un grupo de proteínas auxiliares denominadas chaperonas, tales como calnexina, calreticulina, ErP57 y tapasina<sup>22</sup>. La asociación del péptido antigénico con la cadena pesada (alfa) y la cadena ligera ( $\beta$ -microglobulina) en el RE, permite la conformación de un complejo trimérico que posteriormente es transportado al aparato de Golgi para ser glicosilado. Finalmente el complejo trimérico MHC clase I es transportado a la membrana celular y el péptido

asociado queda dispuesto al reconocimiento por el receptor de los linfocitos T citotóxicos<sup>23</sup> (Figura 1).

Por otro lado, las moléculas MHC-II, al igual que las moléculas de MHC I, son glicoproteínas transmembranales, y están conformadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena denominada alfa ( $\alpha$ ) con peso molecular de 34,000 Da y una cadena beta ( $\beta$ ) con peso de 28,000 Da, ambas cadenas están conformadas por dos dominios extracelulares (Figura 1). También se ha observado una considerable homología secuencial con las moléculas clase I del MHC, así como un patrón de plegamiento en el cual los dominios  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ , los cuales son los más cercanos a la membrana celular, asumen el patrón de plegamiento de las inmunoglobulinas; mientras que los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de las moléculas MHC-II, imitan a los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de las moléculas MHC-I, en cuanto a la formación de una cavidad que se encuentra rodeada por dos hélices  $\alpha$  y una base  $\beta$ -plegada, y en la cual se aloja el péptido<sup>24</sup>. Los péptidos antigénicos que se unen a las moléculas MHC-II, provienen de antígenos que son endocitados por las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) y son dispuestos en compartimientos vesiculares denominados endosomas, en donde son digeridos por las enzimas existentes en estos compartimientos que contienen un pH característicamente ácido<sup>6-7</sup>. Por otro lado, en el RE, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen a las moléculas MHC clase II, se unen a un polipéptido denominado cadena invariante (Ii), el cual también funciona como chaperona. Estas proteínas son conducidas hacia el aparato de Golgi y posteriormente transportadas en vesículas hacia los compartimientos endosomales que contienen a los antígenos previamente digeridos<sup>25</sup>. La fusión de éstas vesículas con los endosomas da origen a los compartimientos denominados MIIC, en donde las moléculas MHC clase II son cargadas con los péptidos antigénicos generados. En este proceso, la cadena Ii es digerida en pequeños fragmentos, uno de los cuales llamado CLIP, que queda unido en el receptáculo de las moléculas MHC clase II, es reemplazado por los péptidos antigénicos que serán presentados en la membrana celular. Las moléculas DM (similares a las moléculas MHC-II) facilitan este reemplazo<sup>26</sup> (Figura 1).

El reconocimiento de un péptido presentado por una molécula MHC clase I a través del receptor del linfocito T CD8<sup>+</sup> no es suficiente para activar la citotoxicidad mediada por estas células, sino que requiere de varias señales adicionales; entre ellas, un coestímulo dado por la interacción de la molécula CD28 de la superficie del linfocito T CD8<sup>+</sup>, con la molécula B7 encontrada en la superficie de la célula blanco o célula presentadora del antígeno, además de las citocinas liberadas por los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Figura 1). En ausencia de las señales coestimuladoras, la interacción de los receptores de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con los péptidos presentados por las moléculas MHC clase II, puede conducir a anergia, tolerancia o apoptosis<sup>6-7,14</sup>.

La baja inmunogenicidad (generación de la respuesta inmune) de las células tumorales puede ser debida a varios factores: a) que la célula tumoral no genere péptidos con secuencias mutantes

derivadas de una proteína oncogénica; b) que la célula produzca péptidos tumor específicos, pero con baja afinidad para moléculas MHC clase I o II; c) expresión de factores supresores de linfocitos T por las células tumorales. Además de estos factores otros aspectos pueden jugar un papel importante, por ejemplo: i) defectos en el procesamiento y transporte de péptidos; ii) baja expresión de moléculas MHC en la membrana de la célula tumoral; iii) falla en la producción de moléculas coestimuladoras por las células tumorales<sup>27</sup>.

Estos mecanismos que conducen finalmente a la evasión de la respuesta inmune por los tumores, pueden ser consecuencia de los cambios fenotípicos y genotípicos que ocurren durante la evolución del tumor<sup>28, 29</sup>.

### IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS TUMORALES RECONOCIDOS POR LINFOCITOS T

Con base en una gran cantidad de estudios de investigación básica y clínica, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, se ha obtenido un gran cuerpo de evidencias que demuestran que los LTCs reconocen y destruyen a las células cancerosas autólogas en un contexto de restricción al HLA<sup>30</sup>. Por lo que en el tratamiento del cáncer, particularmente en pacientes con cáncer avanzado y con tumores metastásicos (aquellos que se dispersan a diferentes sitios de su origen), una de las principales estrategias ha sido la de utilizar el sistema inmune con la finalidad de revertir a la enfermedad. En esta estrategia, denominada Inmunoterapia del Cáncer, uno de los principales requerimientos es la identificación de los péptidos inmunogénicos (**epítopes**), que estimulan a los linfocitos T citotóxicos y auxiliares, para usarlos en la vacunación de pacientes con cáncer<sup>15, 30-32</sup>. Gracias al avance de las técnicas de biología molecular y celular, se han podido identificar a algunos genes que codifican para antígenos tumorales. No obstante hasta ahora, varios de los epítopes identificados para estimular a los linfocitos T se limitan a melanoma maligno, y a pesar de haber una mayor prevalencia de tumores malignos de piel y sarcomas (tumores de tejido muscular), muy pocos epítopes han sido identificados para el rechazo de estos últimos tumores<sup>33</sup>.

Hasta el momento se han utilizado cuatro estrategias metodológicas para la identificación de epítopes tumorales<sup>34</sup>: 1) **Método de clonación**: a través del cultivo de líneas celulares tumorales con linfocitos T autólogos del paciente, se obtienen líneas celulares de LTCs. Por otra parte, se obtiene una biblioteca de ADN clonado (ADNc) de las líneas celulares tumorales y es co-transfectada junto con ADNc que codifica para alelos HLA clase I particulares en la línea celular COS7. Después de analizar la respuesta de los linfocitos T sobre las células blanco COS7, las secuencias aminoacídicas de cada uno de los epítopes se confirma mediante ensayos de detección de citocinas de los linfocitos estimulados, utilizando péptidos sintéticos derivados de la secuencia del gen tumoral clonado. El éxito de este método depende del establecimiento de las líneas celulares, debido a ello los antígenos de melanoma han tenido éxito en su identificación<sup>35</sup>. 2) **Elución ácida**: a través de este método, se obtienen complejos HLA-péptidos de la superficie de las células tumorales, los

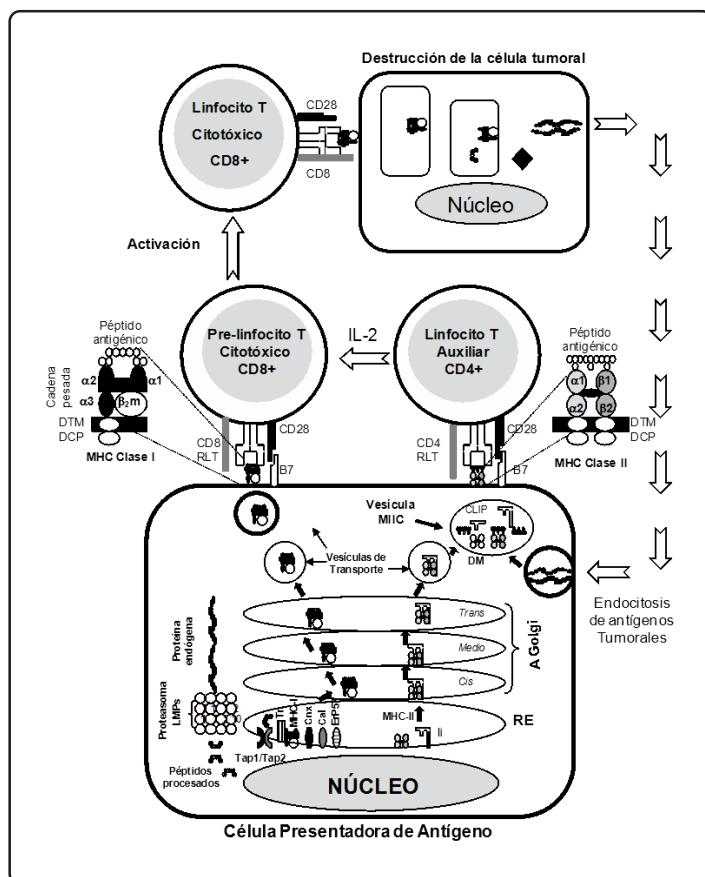


Figura 1. Vías de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC clase I y II, activación y coestímulo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> a través de CD28-B7<sup>15</sup>. La activación del linfocito T citotóxico no solo requiere de la presentación de péptidos por las moléculas MHC clase I (ver texto), sino también del coestímulo dado por la interacción de CD28 (de la superficie del linfocito) con B7 (de la superficie de la célula presentadora de antígenos) y la eventual expresión de citocinas como IL-2, producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que se activan con péptidos derivados de antígenos tumorales endocitados, procesados y presentados por moléculas MHC clase II (ver texto). RE, retículo endoplásmico; LMP-2, 7 y 10, proteínas del proteasoma de bajo peso molecular; Tap 1 y 2, transportadores asociados al procesamiento de antígenos; MHC-I, II, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II;  $\beta_2m$ , cadena ligera beta 2 microglobulina; Tn, tapasina; Cnx, calnexina; Cal, calreticulina; ErP57, proteína del RE de 57 kilodaltones; Ii, cadena invariante; RLT, receptor del linfocito T; DTM, dominio transmembranal, DCP, dominio citoplásmico; CLIP, fragmento de la li que se une a la molécula MHC-II; DM, molécula similar a MHC-II que favorece el intercambio del péptidos antigénicos por el CLIP.

péptidos son eluidos y posteriormente separados mediante fase reversa en cromatografía en líquido de alta resolución, y cada fracción de péptidos es ensayada para determinar su actividad antigénica para estimular linfocitos T. Finalmente la secuencia de aminoácidos de los péptidos antigénicos es determinada usando el método de degradación por Edman. A pesar de la complejidad metodológica utilizada por éste método, para obtener e identificar a los epítopes tumorales, éstos se obtienen de una forma más fisiológica<sup>36</sup>. En nuestro laboratorio de investigación, mediante elución ácida, logramos obtener péptidos

antigénicos asociados a moléculas HLA clase I derivadas de una línea celular de cáncer cérvico uterino<sup>37</sup>. Después de la secuenciación por EDMAN, identificamos que uno de los péptidos antigénicos (NVFPIFLQM), secuencia 54-62, provenía de la proteína L1 de HPV18. Éste péptido indujo la estimulación de linfocitos T de pacientes con cáncer cervical y positivas a la infección con HPV18 en el contexto del alelo HLA-Cw4 de las moléculas MHC clase I. 3) **SEREX**: en este método, un fago lambda que contiene una biblioteca de ADNc de un tumor, es transfectado en la bacteria *Escherichia coli* y las proteínas recombinantes obtenidas, son transferidas a membranas de nitrocelulosa para ser analizadas con el suero autólogo del paciente. En este caso, los anticuerpos contenidos en el suero de los pacientes pueden reaccionar contra las proteínas recombinantes y péptidos derivados de estas proteínas pueden ser simultáneamente blancos de los LTCs. Esta metodología puede ser importante para identificar epítopes de tumores epiteliales o sarcomas, de los cuales es difícil obtener líneas celulares<sup>38</sup>. 4) **Predicción de epítopes por algoritmos**: Una vez que se identifican los oncogenes y genes mutados en las células tumorales, sus productos protéicos (en forma de secuencias totales o parciales) pueden ser analizados en varios programas de algoritmos<sup>39</sup>, para predecir las secuencias peptídicas de 8-10 aminoácidos o mayores de 10 aminoácidos que se unen con alta afinidad a alelos específicos HLA clase I o II, tomando como base ciertos aminoácidos de anclaje característicos para cada alelo. Los péptidos obtenidos mediante estos programas son sintetizados y utilizados para estimular linfocitos T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> a través de ensayos de presentación antigénica. Su inmunogenicidad es evaluada mediante ensayos de citotoxicidad o producción de citocinas específicas de los linfocitos T estimulados con estos péptidos. A través de este método, se ha podido identificar un número creciente de epítopes tumorales y virales<sup>39</sup>. Usando esta metodología en nuestro laboratorio, también hemos logrado identificar a un par de péptidos antigénicos homólogos restringidos al alelo HLA-B39<sup>40</sup>, uno de los alelos HLA clase I de mayor frecuencia en la población mexicana<sup>41</sup>. Los péptidos homólogos IHSMNSTIL e IHSMNSSIL derivados de las proteínas L1 de HPV16 y 18 respectivamente, fueron capaces de estimular LTCs de pacientes con cáncer cervical avanzado y con infección de HPV16 y 18. El péptido IHSMNSSIL sólo indujo estímulo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con infección de HPV18. Asimismo encontramos que los linfocitos T estimulados con ambos péptidos fueron capaces de matar a células tumorales de una línea celular autóloga<sup>40</sup>. Además estas secuencias peptídicas comparten alta homología con secuencias derivadas de HPV45, HPV38 y HPV5 que se asocian con lesiones benignas y malignas de piel tal como verrugas, epidermodisplasias, carcinoma cervical *in situ* y carcinoma cervical avanzado; las cuales podrían ser interesantes para evaluar su actividad antigénica en pacientes con este tipo de lesiones.

## CATÁLOGO DE ANTÍGENOS TUMORALES

De acuerdo con las poblaciones de linfocitos T que han sido estimuladas por los péptidos inmunogénicos, los antígenos tumorales se han clasificado en dos tipos: antígenos reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y antígenos reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>34</sup>.

**A) Antígenos reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** De acuerdo a sus características, éstos antígenos se subdividen en: **a) Antígenos tumor-específicos compartidos** (Tabla 4): estos antígenos son comunes en tumores de varios tipos histológicos, pero no en tejidos somáticos con excepción del testículo, debido a ello son conocidos también como antígenos testiculares. Debido a la carencia de moléculas HLA clase I en las células normales germinales en el testículo, éstas escapan al reconocimiento de LTCs. Originalmente se identificaron como antígenos de melanoma y varios de ellos se han utilizado en la inmunoterapia de diferentes tipos tumorales<sup>12,33-34</sup>. **b) Antígenos de diferenciación** (Tabla 4): estos antígenos se caracterizan por ser tejido-específicos, en algunos casos son compartidos con otros tumores o con tejidos normales. A diferencia de los testiculares, estos antígenos solo son aplicables a los tumores correspondientes. También la inmunoterapia contra tejidos normales, tal como el vitiligo observado en estudios de melanoma, se basa en este tipo de péptidos<sup>33-34</sup>. **c) Antígenos mutados** (Tabla 4): los antígenos de este grupo solo son expresados en tumores pero no en tejido normal y no son compartidos entre tumores de diferente tipo histológico<sup>9, 42</sup>. Estos antígenos se obtienen como resultado de mutaciones y translocaciones relacionadas con el proceso oncogénico, así como con infección viral. La identificación de los antígenos de este grupo se basa en el uso de algoritmos de predicción al conocer la secuencia oncogénica con potencial antigénica, y la subsecuente evaluación de la actividad antigénica de los péptidos sintéticos, más que por el cultivo de células tumorales con los LTCs<sup>39</sup>.

**B) Antígenos reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>** (Tabla 4). La identificación de estos antígenos se basa en un método de biología molecular en donde un gene que codifica para la cadena invariante y el ADNc del oncogen son fusionados y transfectados en líneas celulares positivas para HLA clase II. La construcción de los genes correspondientes a la cadena invariante Ii y del oncogene, permite que sus productos protéicos se unan a las moléculas HLA clase II en el RE y posteriormente cuando son transportadas hacia los compartimientos endosomales MIIC, se generen los péptidos correspondientes para unirse a las moléculas HLA clase II en los lisosomas, después son transportados hacia la membrana<sup>43-44</sup> (Figura 1). Estos antígenos pueden actuar como inmunopotenciadores en conjunto con péptidos presentados a linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>34</sup>.

## VACUNACIÓN CON PÉPTIDOS Y RESPUESTA DE LINFOCITOS T

Hasta el momento, la vacunación de pacientes con cáncer mediante la aplicación de epítopes que son reconocidos por linfocitos T, ha dado como resultado, en términos generales, que

una pequeña porción de los pacientes vacunados presenten regresión tumoral (disminución o eliminación tumoral). No obstante, en varios de los casos de vacunación con péptidos, se ha logrado inducir respuesta inmune mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> a pesar de no producir regresiones tumorales<sup>44</sup> (Tabla 5). En esta tabla, se resumen los resultados de varios ensayos clínicos de vacunas basadas con péptidos usando los siguientes antígenos tumorales: **a) HER-2/NEU**: es un miembro de la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidermal. Este receptor consiste de un dominio extracelular (DE) el cual se une al ligando, y un dominio intracelular (DI), el cual es involucrado en la señalización. El gene HER-2/neu se presenta en las células normales como una sola copia. La amplificación del gene y la sobre-expresión de las proteínas asociadas han sido identificadas en muchos tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, ovario, y adenocarcinoma de pulmón<sup>45</sup>. Péptidos de 15-18 aminoácidos correspondientes a los dominios DE e DI de esta proteína que se unen a moléculas MHC clase I y II han sido identificados y utilizados en vacunación. Después de vacunar a 32 pacientes con cáncer avanzado, se encontró que la principal respuesta inmune fue mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo cual fue reflejado por la respuesta de hipersensibilidad tardía (HT) en el sitio de aplicación. La respuesta mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> se encontró en 25% de los pacientes<sup>46</sup>. **b) Virus de papiloma humano (HPV)**: la integración de los HPVs de alto riesgo (HPV 16 y 18) en el genoma celular del epitelio cervical, conduce a la sobre-expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. La proteína E7 se une a la forma hipofosforilada de la proteína de retinoblastoma (Rb) y desplaza el factor de transcripción E2F<sup>47</sup>; mientras que la proteína E6 se une y facilita la degradación de p53<sup>48</sup>. En consecuencia, se deshabilitan las proteínas supresoras del tumor en las células blanco, conduciendo al desarrollo del cáncer. Los HPVs de alto riesgo además de identificarse como agentes causantes de cáncer cervical, también se les asocia en cáncer de pene, de ano y faringe<sup>49</sup>. Una gran cantidad de péptidos inmunogénicos de diferentes proteínas y tipos de HPVs han sido identificados para muchos haplotipos de HLA<sup>50-51</sup>. Hasta ahora, tres ensayos clínicos con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 han sido completados. En estos ensayos, la principal respuesta de inmunoreactividad observada fue mediada por LTCs. En el primer ensayo, al aplicar el octapéptido 86-93 de E7/HPV16 específico para el alelo HLA-A\*0201 junto con un péptido activador de la respuesta CD4<sup>+</sup> denominado PADRE, sólo 2/12 pacientes presentaron alivio y estabilidad de su enfermedad<sup>52</sup>; en un segundo ensayo clínico, la aplicación sucesiva de 100, 300 y 1000 µg de los péptidos con secuencias 11-20 y 86-93 de E7 de HPV 16 junto con el péptido PADRE en pacientes con cáncer cervical avanzado y postratamiento de quimioterapia, se observó que en 11/19 pacientes hubo infiltración de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en las tumoraciones, sin embargo en sólo dos pacientes la enfermedad permaneció estable y en las demás se observó progresión de la enfermedad<sup>53</sup>; finalmente en el tercer ensayo clínico usando el péptido 12-20 de E7 de HPV16 junto con adyuvante incompleto de Freud, se observó que 9/18 pacientes con tumoraciones en estadios clínicos II y III tuvieron regresiones parciales y 3 de ellos



<b>A) Antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T CD8+.</b>		
<b>a) Antígenos tumorales compartidos o antígenos testiculares.</b>		
Gene	HLA	Péptido
MAGE-1	A1	EADPTGHSY
MAGE-3	A2	FLWGPRALV
BAGE	Cw16	AARAVFLAL
GAGE	Cw6	YRPRPRRY
NY-ESO-1	A2	SLLMWITQC
SART-1	A26	KGSGKMKTE
<b>b) Antígenos de diferenciación.</b>		
Gene	HLA	Péptido
Tirosina	A1	KCDICTDEY
MART-1/Melan-A	A2	AAGIGILTV
gp100	A2	AMLGHTTMEV
gp75/trp-1, trp-2	Aw31	MSLQRQFLR
CEA	A2	YLSGANLNL
PSA	A2	FLTPKKLQCV
<b>c) Antígenos tumorales mutados.</b>		
Gene	HLA	Péptido
MUM-1	B44	EEKLIVVLF
CDK-4	A2	ACDPHSGHFV
B-Catenina	A24	SYLCSGIHF
Capasa-8	B35	FPSDSWCYF
KIAA0205	B44	AEPINIQTW
BCR-ABL	A2	SSKALQRPV
E7/HPV16	A2	YMLDLQPETT
<b>B) Antígenos tumorales reconocidos por linfocitos CD4+.</b>		
Gene	HLA	Péptido
Tirosina	DR4	QNILLSNAPLGPQFP
Gp100	DR4	WNROLPEWTEAQRDL
MAGE-3	DR11	TSYVKVLHMHVKISG
TPI	DR1	GELIGILNAAKVPAD
LRFP	DR1	PVIWRRAPA
CDC27	DR4	FSWAMDLDPKGA

**Tabla 4. Catálogo de antígenos tumorales. Genes codificantes para antígenos tumorales y ejemplos de epítopes con su restricción antigénica HLA<sup>34</sup>.**

regresión total, adicionalmente en 12/18 pacientes se observó eliminación de la infección con HPV a través de PCR en células de frotis, sin embargo en las biopsias se detectó ARN viral mediante PCR<sup>54</sup>. **c) PSMA:** En varios estudios de aplicación clínica en pacientes con cáncer prostático, usando los péptidos PSM-P1 y PSM-P2, derivados del antígeno de próstata PSMA<sup>55-</sup>

<sup>56</sup>, con especificidad para el alelo HLA-A\*0201, se han observado reducciones tumorales parciales en 7/51, 19/62, 11/37 y 6/25 y totales en 2/25 al utilizar células dendríticas autólogas<sup>57</sup>. La principal actividad antitumoral fue mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se observó una reducción de más del 50% del antígeno prostático a nivel plasmático en todos los casos<sup>58-60</sup>. **d) CEA:** El antígeno carcinoembrionario (CEA), pertenece a una familia constituída de 29 genes localizados en el cromosoma 19 y ha sido identificado como un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas<sup>61</sup>. La proteína CEA es una molécula de adhesión y es sobre-expresada en la mayoría de los carcinomas colorectales, gástricos, pancreáticos, de mama, y de células no pequeñas de pulmón<sup>62</sup>. En tres ensayos clínicos de fase I se ha aplicado el péptido CAP-1 derivado de CEA y restringido al alelo HLA-A\*0201. En uno de los ensayos clínicos se observó que 1/19 pacientes tuvo respuesta menor al aplicarse el péptido con células dendríticas<sup>63</sup>; en otro ensayo se encontró respuesta mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup> pero no hubo modificación en la enfermedad de los pacientes<sup>64</sup>; y finalmente en el tercer ensayo, se encontró respuesta parcial en 1/7 pacientes con carcinoma medular de tiroides, usando el péptido CAP-1 y células dendríticas cargadas con calcitonina<sup>65</sup>. **e) MUC1:** Mucin-1 (MUC1), es un miembro de la familia de glicoproteínas de membrana compuesta de un polipéptido cuya secuencia contiene múltiples repeticiones de 20 aminoácidos (referidas como VNTR), las cuales son altamente glicosiladas. Las mucinas son producidas por células de origen epitelial y son abundantes en la superficie apical de estas células para formar glándulas. En cáncer, MUC1 es sobre-expresada y a menudo presente en la superficie celular en lugar de restringirse a la membrana basal como usualmente ocurre en tejido normal<sup>66</sup>. Varios ensayos clínicos de fase I se han aplicado en pacientes con diversos tipos tumorales. En uno de ellos, el péptido Cp 13-32 (CPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP) de un segmento VNTR de la proteína MUC1 asociado con toxina de difteria fue aplicado a 13 pacientes. Los pacientes mostraron débil respuesta mediada por anticuerpos y respuesta proliferativa de linfocitos T asociada con reacciones de HT por la aplicación de MUC1<sup>67</sup>. En otro ensayo, 5 repeticiones VNTR fueron aplicados a 63 pacientes con cáncer de páncreas, mama y colon. Todos los pacientes mostraron ulceración en el sitio de la aplicación, 37/55 de las biopsias analizadas mostraron infiltración de linfocitos T aunque no hubo regresiones importantes<sup>68</sup>. En otro ensayo, la aplicación de 5 repeticiones VNTR junto con adyuvantes convencionales a 25 pacientes con cáncer metastásico de colon, estómago, recto y mama, se observó que 13/25 generaron anticuerpos contra MUC1 y la actividad de LTCs contra los epítopes STAPPAHG o PAPGSTAP se observó en 7 pacientes, mientras que la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se observó en 4/14 pacientes vacunados<sup>69</sup>. En un cuarto ensayo clínico, la aplicación de un péptido de 16 aminoácidos de la región VNTR junto con hemocianina y adyuvante DETOX se indujeron LTCs contra péptidos de MUC1 en 7/11 pacientes<sup>70</sup>. En otro ensayo, el uso de 1.5 fracciones de VNTR y varios adyuvantes, condujeron a la generación de anticuerpos IgM e IgG durante 101-137 semanas de aplicación en los pacientes<sup>71</sup>. En un ensayo reciente, la aplicación de repeticiones VNTR fusionadas como GST y

asociadas con manosa y en adición a la aplicación de ciclofosfamida, indujo un incremento de la respuesta inmune celular en el 28% de los pacientes y sólo 5/41 pacientes mostraron estabilidad en su enfermedad<sup>72</sup>. **f) RAS:** los proto-oncogenes de p21 *ras* (*K-ras*, *H-ras* y *N-ras*) se encuentran mutados en una amplia variedad de tumores incluyendo carcinomas de colon, pulmón, páncreas y melanomas<sup>73</sup>. Las mutaciones más comunes se dan en los codones 12 y 61; la glicina codificada normalmente por el codon 12 es cambiada por un ácido aspártico, una valina o una cisteína. Estas mutaciones en *ras* resultan en la producción

de la proteína G p21, que es continuamente activa, produciendo transformación celular y tumorigenesis. Estos sitios de mutación son capaces de generar epítopes nuevos que se unen a moléculas HLA e inducir la respuesta inmune contra *ras* mutada. Varios epítopes derivados de *K-ras* mutada en el codon 12, 13 y 61, específicos para moléculas MHC clase I y II se han identificado para tumores humanos y de ratón<sup>74</sup>. La aplicación clínica del péptido 5-21 (conteniendo la mutación en el codon 12) en pacientes con carcinoma pancreático, indujo respuesta proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> restringidos a HLA-DR6 y

Proteína	Péptido Epítipo	Respuesta celular	Respuesta clínica	Efectos secundarios
HER-2/neu	DI 15-18 aa Péptidos-HLA-A2 DI y DE	CD4+, HT CD4+, CD8+	No Examinado No Examinado	Notóxico Salpullido en piel
HPV16 E7	aa 86-93+ ady aa 11-20+86- 93+ady aa 11-20/86-93	CD8+ CD4+ CD8+	No Examinado  9/17 regresión parcial; 12/18 eliminación de HPV	Dolor inyecc. Linfopenia eritema local, granuloma, eritema, diarrea.
PSMA	PSM-P1 (LLHETDSAV)  PSM-P2 (ALFDIESKV)	CD8+, HT  CD8+	Reducción 7/51, 19/62, 11/37 Resp. Parc. 6/25; Resp. Tot. 2/25	Baja toxicidad, Hipotensión Baja toxicidad
CEA	CAP-1 (YLSGANLNL)	Ninguno CD8+ HT	1/19 resp. Baja No Examinado 1/7 resp. parcial	Baja toxicidad No examinado Ninguno
MUC-1	VNTR (cp 13-32) VNTR (5 rep) VNTR (5 rep)+ Mannan GVTSAPDTRPAPG STA+KLH	Anticuerpo, CD8+ HT	No Reportada	Baja toxicidad. Ulceración Local, fiebre y malestar
MUC-1	VNTR (1-5 rep)+ KLH VNTR (5 REP)+ GST+mannan	Anticuerpos  HT, CD8+, Anticuerpos	Recurrencia en 2/9 pacientes de alto riesgo	Reacc. Local, Resfriado, eritema en el sitio de la inyecc.
K-ras	Ras (aa 5-21)	CD4+, HT CD8+	Incrementó la Sobrevivencia media	Notóxico
K-ras	Ras (aa 5-17)	CD4+	Ninguna	Notóxico
N-ras	Ras (aa 49-79)	HT CD4+	No examinado	No examinado

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas clínicas con vacunas anti-tumorales basadas en péptidos<sup>44</sup>. DI, dominio intracelular; DE, dominio extracelular; HT, hipersensibilidad tardía; HPV, virus de papiloma humano; dominio VNTR, (PDTRPAPGSTAPPAHGVSTA)-glicosilado.

DQ2. Los linfocitos T HLA-DR6 fueron capaces de matar a células autólogas cargadas con el péptido mutado<sup>75</sup>. En otro ensayo clínico, utilizando el péptido 5-17 con el sitio de mutación junto con el adyuvante DETOX, se encontró respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en 3/10 pacientes restringidos al alelo HLA-A2<sup>76</sup>. En otro estudio, utilizando el mismo péptido en presencia de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, se encontró que 25/43 pacientes desarrollaron respuesta mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, logrando prolongar la vida media de los pacientes vacunados<sup>77</sup>. Recientemente, la aplicación del péptido 49-63 de la proteína N-ras (conteniendo la mutación del codon 61) a 10 pacientes con melanoma, permitió la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en 8/10 pacientes<sup>78</sup>.

Cabe mencionar que los síntomas experimentados por la mayoría de los pacientes, entre los cuales se destaca el eritema, náusea, debilidad, y en algunos casos leucopenia (Tabla 5), fueron asociados al uso de algunos de los adyuvantes utilizados en la aplicación de las vacunas, no obstante, fueron reversibles al término de los tratamientos. Asimismo, la baja respuesta encontrada en la mayoría de los pacientes vacunados, se asocia a que muchos de los pacientes fueron vacunados después del tratamiento de quimioterapia o radioterapia y, además, a que cursaban con tumores avanzados incluso metastásicos<sup>44</sup>.

### PROS Y CONTRAS DE LA VACUNACIÓN CON PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS

Con base en los primeros ensayos clínicos en fase I y fase II llevados a cabo en algunos pacientes con cáncer avanzado (Tabla 5), como se describió previamente, se pueden inferir algunas ventajas y desventajas de la vacunación basada en péptidos inmunogénicos. **a) Pros.** Una vez identificadas las proteínas antigénicas potenciales, se pueden diseñar, predecir e identificar a los péptidos antigénicos específicos para varios alelos HLA clase I y II de alta frecuencia en una población determinada. Para antígenos compartidos en varios tumores, algunos péptidos pudieran ser utilizados para vacunar a varios pacientes con diferentes tipos de cáncer. Los efectos secundarios (náusea, salpullido, eritema, diarrea, hipotensión y linfopenia) producidos durante la aplicación de vacunas con péptidos en combinación con algunos tipos de adyuvantes o citocinas, han resultado ser reversibles en los pacientes al término del tratamiento<sup>44</sup>. Asimismo, varios péptidos antigénicos pueden ser aplicados a la vez en una vacuna. Uno de los aspectos de gran relevancia de la inmunoterapia basada en péptidos, y que se ha venido realizando en los últimos años, es la relativa facilidad para el monitoreo de la respuesta inmune celular. Los métodos de monitoreo se han basado en determinar la funcionalidad de los linfocitos T mediante técnicas como el ELISPOT, en donde se detecta la producción de ciertas citocinas o moléculas efectoras producidas por los linfocitos T estimulados durante y después de la vacunación con péptidos, además de apoyarse en otros métodos como el de PCR de tiempo real y los ensayos de citotoxicidad sobre células blanco que presentan al péptido/

MHC en su membrana celular<sup>30</sup>. Otro de los métodos utilizados en el análisis de las poblaciones de linfocitos T estimulados durante la vacunación, involucra el uso de complejos tetraméricos solubles recombinantes, constituidos por cuatro moléculas MHC cargadas con el péptido vacunal y asociadas a una molécula de avidina mediante una molécula de biotina anclada en el extremo carboxilo de las moléculas de MHC. La adición de fluorocromos, como la ficoeritrina, a estos complejos, es indispensable para poder detectar mediante citometría de flujo a las poblaciones de linfocitos T antígeno-específicos, que se unen vía sus receptores a estos tetrámeros. Con estas técnicas ha sido posible detectar a las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a niveles tan bajos como 0.2% en nódulos linfáticos y de 0.01% en poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en sangre periférica<sup>79</sup>. **b) Contras:** se ha mencionado que la alta especificidad de los epítopes específicos que se unen a alelos particulares de moléculas HLA clase I o II, puede limitar el potencial de estímulo de las poblaciones de linfocitos T. Además, si a esta limitante se le suma el fenómeno de modulación de las moléculas MHC en membrana de las células tumorales, tal como ocurre eventualmente en algunos tumores avanzados, puede resultar en una deficiente respuesta inmune celular contra el tumor, a pesar de que se hayan generado poblaciones activas de linfocitos T antígeno-específicos<sup>80</sup>. Lo cual pudo haber ocurrido en algunos de los casos de vacunación expuestos previamente (Tabla 5). Otro aspecto reportado, ha sido la anergia (ausencia de activación) de linfocitos T o tolerancia inmune (ausencia de respuesta inmunológica hacia antígenos propios), que ocurre cuando se utilizan péptidos de antígenos encontrados también en células normales<sup>81</sup>.

### PERSPECTIVAS DE LA INMUNOTERAPIA TUMORAL BASADA EN PÉPTIDOS

Desde que a finales de los 80's se dio a conocer la estructura tridimensional de las proteínas que constituyen al complejo MHC clase I, a través del análisis cristalográfico por rayos X, y se descubre que estas moléculas contienen péptidos capaces de activar a los linfocitos T<sup>19</sup>, muy pocos epítopes tumorales han sido identificados hasta nuestros días.

Como se ha expuesto anteriormente, la aplicación clínica de algunos de algunos epítopes tumorales a pacientes con cáncer avanzado, ha sido capaz de generar en ellos respuesta inmune específica mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y linfocitos B; no obstante, en la mayoría de los casos no fue posible erradicar completamente a los tumores o metástasis derivadas de ellos, por lo que otros factores intrínsecos del tumor, como la modulación antigénica o la disminución de moléculas HLA en la membrana, pudieron haber conducido al escape inmunológico<sup>27</sup>.

Por otro lado, en el caso de los antígenos tumorales asociados al cáncer cérvico uterino, como son las proteínas del HPV, los resultados han sido más alentadores debido a que su aplicación en etapas previas a la aparición de la enfermedad, ha permitido incluso la prevención de la infección por HPV<sup>82</sup>, la cual es considerada como el agente disparador de la generación de la

neoplasia cervical en casi el 100% de los casos<sup>49</sup>. Lo cual implica que el uso de vacunas profilácticas contra el cáncer a base de epítopes derivados de las proteínas blanco de los tumores, debe ser una mejor estrategia para combatir el desarrollo del cáncer. De hecho, el uso de AAT derivados de proteínas oncogénicas y de proteínas mutadas de receptores de factores de crecimiento celular en modelos de ratones transgénicos, ha producido resultados fehacientes de inmunoprevención específica<sup>83</sup>. En consecuencia, vale la pena la búsqueda de nuevos epítopes tumorales para aplicarlos en vacunas profilácticas.

Aunque muchos de los métodos utilizados para descubrir AAT emplean tumores como fuentes de antígenos, se ha visto que varios de los AAT también son expresados muy tempranamente, por ejemplo en algunas displasias premalignas y metaplasias. Por lo tanto, en varios tumores humanos cuya detección puede ser temprana y oportuna tales como el de colon, mama, próstata y pulmón; y aquellos en donde existe historia familiar o factores de riesgo para su predisposición, será posible aplicar a los antígenos tumorales de manera profiláctica. Asimismo en pacientes cuyos tumores han sido erradicados por terapias convencionales, también podrán ser aplicados para evitar lo que los clínicos llaman, enfermedad mínima residual.

En conclusión, la aplicación de la tecnología para descubrir nuevos antígenos tumorales y/o sus epítopes y la aplicación de vacunas profilácticas junto con el seguimiento de los métodos para la detección oportuna del cáncer, deberán ser las mejores estrategias que la Inmunología Tumoral puede ofrecer en la lucha contra el cáncer.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos agradecer el apoyo recibido por los programas DGAPA-PAPIIT No. IN210501 y CONACYT No. 34835-M.

## REFERENCIAS

- Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2001; 21: 167-223.
- Mellors RC. Etiology of Cancer: Carcinogenesis. In: *Neoplasia*. Weill Medical College of Cornell University. <http://edcenter.med.cornell.edu/CUMC>.
- Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *CagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research* 1995; 55: 2111-2115.
- Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 181-191.
- Hall J, Angele S. Radiation, DNA damage and cancer. *Mol Med Today* 1999; 5: 157-164.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: the Immune System in Health and Disease*. 5<sup>th</sup> ed. New York: Current Biology Limited, 2001: 1-385.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. New York: Mosby, 2001: 289-302.
- zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 690-698.
- Urban JL, Schreiber H. Tumor antigens. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 617-644.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677.
- Boon T. Tumor antigens and perspectives for cancer immunotherapy. *Immunologist* 1995; 3: 262-263.
- Disis ML, Cheever MA. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 637-642.
- Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 380-384.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB SAUNDERS COMPANY, 2000: 1-207.
- Pandey M, Mathew A, Nair MK. Cancer vaccines: a step towards prevention and treatment of cancer. *Eur J of Surgical Oncology* 1999; 25: 209-214.
- York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 369-396.
- Lechler R, Warrens A. *HLA in Health and Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2000: 3-106.
- Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 403-450.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329: 512-518.
- Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379.
- Kleijmeer M, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 1992; 357: 342-344.
- Grande AG, van Kaer L. Tapasin: An ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 2001; 22: 194-199.
- Parmer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 323-358.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. The tridimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRI. *Nature* 1993; 364: 33-39.
- Nelson CA, Fremont DH. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 47-59.
- Watts C, Powis S. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 60-74.
- García-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance and tumor immune escape. *J of Cellular Physiology* 2003; 195: 346-355.

## VERTIENTES

28. García-Lora A, Algarra I, Gatorio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer* 2001; 91: 109-119.
29. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619-648.
30. Coulie PG, van der Bruggen P. T-cell responses of vaccinated cancer patients. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 131-137.
31. Boon T, Coulie PG, van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997; 18: 267-268.
32. Restito NP, Sznol M. Cancer vaccines. In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 5<sup>th</sup> ed. Edited by: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia: Lippincott- Raven Press Publishers, 1997: 3023-30-42.
33. Jäger E, Jäger D, Knuth A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 178-182.
34. Nabeta Y, Kawaguchi S, Sato Y, Wada T, Yamashita T, Sato N. Identification strategy and cataloguing of antigenic cancer epitopes. *Mod Asp Immunobiol* 2000; 1: 17-19.
35. van der Bruggen P, Zhang Y, Chau P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 2002; 188: 51-64.
36. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL. Identificación of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264: 716-719.
37. Monroy-García A, Ortíz-Navarrete VF, Mora-García ML, Flores-Borja F, Díaz-Quiñonez A, Isibasi-Araujo A, Trejo-Becerril C, Chacón-Salinas R, Hernández-Montes J, Granados-Arreola J, de Leo C, Weiss-Steider B. Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection. *Immunology Letters* 1999; 67: 167-177.
38. Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:709-716.
39. Nussbaum AK, Kuttler CH, Tenzer S, Schild H. Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 69-74.
40. Monroy-García A, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Ortíz-Navarrete VF, Bañuelos-Pánuco A, Acosta-Araujo A, Díaz-Quiñonez A, López-Graniel CM, Herbert G, Granados J, de Leo C, Silva-López RM, Mora-García ML. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B\*3901 allele. *Arch Virol* 2002; 147: 1933-1942.
41. Vargas-Alarcón G, Gómez-Casado E, Martínez-Lazo J, Granados J, Layriasse Z, Alegre R, Arnaiz-Villena A. Differences in intron 2 sequences between B\*39061 and B\*39062 in Amerindians: comparison with those of B\*3901, B\*5101 and B\*52012 alleles. *Immunogenetics* 1997; 45: 436-439.
42. Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med* 1998; 4: 525-531.
43. Wang RF, Wang X, Rosenberg SA. Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+)T cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1659- 1668.
44. Salit RB, Kast WM, Velders MP. Ins and outs of clinical trials with peptide-based vaccines. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: e204-e213.
45. Disis ML, Cheever MA. HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development. *Crit Rev Immunol* 1998; 18:37-45.
46. Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel DG, Rinn K, Knutson KL. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 347-1350.
47. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
48. Werness B, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
49. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kumer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CL, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
50. Kast WM, Brandt RMP, Sidney J, Drijhout JW, Kubo RT, Grey HM, Melief CJM, Sette A. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol* 1994; 152: 3904-3912.
51. Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, Snoke K, Serra HM, Kubo RT, Sette A. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1994; 1: 751-761.
52. Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marnicola FM. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2103-2109.
53. Rensing M, van Driel WJ, Brandt RMP, Kenter GG, de Jong JH, Bauknecht T, Sette A, Celis E, Grey H, Trimbos BJ, Kast WM, Melief CJM. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* 2000; 23: 255-266.
54. Muterspach L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, Kast WM, Fascio G, Marty V, Weber J. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV16 positive. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3406-3416.
55. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res* 1997; 57: 2321-2324.
56. Murphy GP, Holmes EH, Boynton AL, Kenn GM, Ostenson RC, Erickson SJ, Barren RJ. Comparison of prostate specific antigen, prostate specific membrane antigen, and LNCaP-based enzyme-linked immunosorbent assays in prostatic cancer patients and patients with benign prostatic enlargement. *Prostate* 1995; 26: 164-168.
57. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A\*021-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29:371-380.

58. Tjoa BA, Simmons SJ, Elgamal A, Rogers M, Ragade H, Kenny GM, Trychak RMJ, Boynton AL, Murphy GP. Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* 1999; 40: 125-129.
59. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Ragde H, Boynton AL, Murphy GP. Report of immune monitoring of prostate cancer patients undergoing T-cell therapy using dendritic cells pulsed with HLA-A2 specific peptides from prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Prostate* 1998; 35: 144-151.
60. Murphy GP, Tjoa, Simmons SJ, Rpgers MK, Kenny GM, Jarisch J. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 2000; 43: 59-62.
61. Thompson J, Zimmermann W. The carcinoembryonic antigen gene family-structure, expression and evolution. *Tumor Biol* 1998; 9: 63-73.
62. Hodge JW. Carcinoembryonic antigen as a target for cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 127-134.
63. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lyerly HK. A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1331-1338.
64. Arlen P, Tsang KY, Marshall JL, Chen A, Steinberg SM, Poole D, Hand PH, Schlom J, Hamilton JM. The use of a rapid ELISPOT assay to analyze peptide-specific immune responses in carcinoma patients to peptide vs recombinant poxvirus vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 517-529.
65. Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4965-4969.
66. Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 301-313.
67. Xing P, Michael XM, Apostolopoulos V, Prenzos KAJ, Marschall C, Bishop J, McKenzie IFC. Phase I study of synthetic MIC1 peptides in breast cancer. *Int J Oncol* 1995; 6: 1283-1289.
68. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J Surg Res* 1996; 63: 298-304.
69. Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, Ong CS, Apostolopoulos V, Vaughan H, Xing PX, Jamieson G, Pietersz G, Tail B, Broadbent R, Thynne G, McKenzie IF. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 1997; 100: 2783-2792.
70. Reddish M, MacLean GD, Koganty RR, Kan-Mitchell J, Jones V, Mitchell MS, Longenecker BM. Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int J Cancer* 1998; 76: 817-823.
71. Gileiუსki T, Adluri S, Ragupathi G, Zhang S, Yao J, Panageas K, Moynahan M, Houghton A, Norton L, Livingston PO. Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1693-1701.
72. Karanikas V, Thynne G, Mitchell P, Ong CS, Gunawardana D, Blum R, Pearson J, Lodding J, Pietersz G, Broadbent R, Tait B, McKenzie IF. Mannan mucin-1 peptide immunization: Influenced-cyclophosphamide and the route of injection. *J Immunother* 2001; 24: 172-183.
73. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689.
74. Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol* 1996; 23: 118-134.
75. Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Gedde-Dahl T, Stokke KT, Solheim BG, Egge TS, Soreide O, Thorsby E, Gaudernack G. Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. *Lancet* 1995; 346: 1399-1400.
76. Gjertsen MK, Saeterdal I, Thorsby E, Gaudernack G. Characterization of immune responses in pancreatic carcinoma patients after mutant p<sup>21</sup> ras peptide vaccination. *Br J Cancer* 1996; 65: 450-453.
77. Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhuang I, Soreide O, Eriksen JA, Moller M, Baksaas I, Lothe RA, Saeterdal I, Gaudernack G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant. Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92: 441-450.
78. Hunger RE, Brand CU, Streit M, Eriksen JA, Gjertsen MK, Saeterdal I, Brauthen LR, Gaudernack G. Successful induction of immune responses against mutant ras in melanoma patients using intradermal injection of peptides and GM-CSF as adjuvant. *Exp Dermatol* 2001; 10: 161-167.
79. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Rimoldi D, Lienard D, Lejeune F, Cerottini JCH, Romero P. Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8+ T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1235-1247.
80. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997; 18: 89-95.
81. Seiter S, Marincola FM. The multiple ways to tumor tolerance. *Mod Asp Immunobiol* 2000; 1: 121-124.
82. Lowry DR, Frazer IH. Chapter 16: Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst* 2003; 31: 116-126.
83. Finn OJ, Forni G. Prophylactic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 172-177.