



SECCIÓN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Inmunoterapia activa con una variante estructural del ligando 1 del receptor de muerte programada 1

Camila Canaán-Haden Ayala ¹ <https://orcid.org/0000-0002-7592-0579>

Javier Sánchez Ramírez ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3263-5062>

Mónica Bequet Romero ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0351-857X>

Isabel Gonzalez-Moya ¹ <https://orcid.org/0000-0001-7633-4769>

Rafael Martínez Castillo ¹ <https://orcid.org/0009-0004-1363-1036>

Viviana Falcón Cama ¹ <https://orcid.org/0000-0002-3795-9966>

Daniel Octavio Palenzuela Gardon ¹ <https://orcid.org/0000-0001-9631-8336>

Miladys Limonta Fernández ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1664-5255>

Marta Ayala Ávila ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4441-4953>

Jorge V. Gavilondo Cowley ^{1†}

Yanelys Morera Díaz ^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-6051-5514>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

* Autor para la correspondencia: yanelys.morera@cigb.edu.cu

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: Los inhibidores de los puntos de control inmunitario originaron un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer. En este contexto la inmunoterapia activa abre una vía alentadora para la terapia tumoral dirigida a esta molécula. **Objetivos:** Desarrollar una vacuna basada en una variante estructural del PD-L1 humano que induzca respuesta inmune específica con efectos antitumorales, y estudiar los efectores inmunológicos y su impacto en el microambiente tumoral. **Métodos:** El desarrollo preclínico de PKPD-L1Vac incluyó: diseño in silico del antígeno; expresión en *E. coli*; caracterización fisicoquímica; evaluación de inmunogenicidad en ratones y primates no humanos; y estudio de actividad antitumoral en modelos murinos. **Resultados:** Se generó un antígeno quimérico del dominio extracelular de PD-L1 humano con modificaciones estructurales que reducen su unión a PD-1 y CD80. La vacuna indujo anticuerpos IgG específicos anti-PD-L1 e inmunidad mediada por linfocitos T en ratones y primates no humanos. Mostró actividad antitumoral en modelos CT-26 y B16-F10. Además, aumentó los linfocitos infiltrantes en tumores CT-26 y disminuyó la proporción de células T anérgicas CD3+CD8+PD1+. **Conclusiones:** Estos resultados constituyen la prueba de concepto de una vacuna novedosa basada en una variante modificada de PD-L1 que induce una potente respuesta inmune con actividad antitumoral efectiva en múltiples modelos singénicos de ratón, así como la ruptura de tolerancia inmunológica al PD-L1 humano en un modelo filogenéticamente cercano.

Palabras clave: inmunoterapia; microambiente tumoral; PD-L1; puntos de control inmunitario

Active immunotherapy based on a structural variant of programmed death receptor 1 ligand 1

ABSTRACT

Introduction: Immune checkpoint inhibitors have led to a paradigm shift in cancer treatment. In this context, active immunotherapy represents a promising approach for tumor therapy targeting this molecule. **Objectives:** To develop a vaccine based on a structural variant of human PD-L1 capable of inducing a specific immune response with antitumor effects, and to study the immune effectors involved and their impact on the tumor microenvironment. **Methods:** The preclinical development of PKPD-L1^{Vac} included the following stages: in silico design of the antigen; expression in *E. coli*; physicochemical characterization; evaluation of immunogenicity in mice and non-human primates; and assessment of antitumor activity in murine models. **Results:** A chimeric antigen derived from the extracellular domain of human PD-L1 was generated, featuring structural modifications that reduce its binding affinity to PD-1 and CD80. The vaccine induced specific anti-PD-L1 IgG antibodies and T cell-mediated immunity in both mice and non-human primates. It demonstrated antitumor activity in CT-26 and B16-F10 models. Additionally, it increased tumor-infiltrating lymphocytes in CT-26 tumors and reduced the proportion of anergic CD3+CD8+PD1+ T cells. **Conclusions:** These results provide proof of concept for a novel vaccine based on a modified PD-L1 variant that elicits a potent immune response with effective antitumor activity across multiple syngeneic mouse models, as well as the breaking of immunological tolerance to human PD-L1 in a phylogenetically close model.

Keywords: immunotherapy; tumor microenvironment; PD-L1; immune checkpoint

INTRODUCCIÓN

La vía de señalización del PD-L1 es un componente importante en el mecanismo de inmunosupresión que induce el tumor. Cuando el PD-L1, presente en la superficie de la célula tumoral, interacciona con el receptor PD-1, presente sobre las células T, se induce una cascada de señalización que induce la disminución de la proliferación y diferenciación, la activación de la apoptosis, el incremento de la anergia y el agotamiento funcional en los linfocitos T. También como resultado de la interacción se produce un decremento en la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α . Esta interacción, además se relaciona con afectaciones en la capacidad de las células dendríticas de realizar la presentación de antígenos o con la presencia de linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica disminuida.

La unión ligando-receptor también se vincula con la estimulación de la expansión o actividad de tipos celulares pro-tumorales como las células mieloides supresoras (MDSC, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*) y los linfocitos T CD4+ reguladores (T regs).^(1,2) Por lo tanto, el bloqueo de estos puntos de control inmunitarios se convirtió en una di-

rección importante de la inmunoterapia en los últimos años para eliminar la supresión inmunitaria y restaurar la función del sistema inmunitario.

La inmunoterapia con inhibidores de PD-L1 está bien establecida para varios tipos de cáncer y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, sigla en inglés) aprobó hasta ahora 3 anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos a la molécula PD-L1: atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) y durvalumab (Imfinzi).⁽³⁾ El tratamiento con estos anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 demuestran éxito clínico. Sin embargo, estas inmunoterapias pasivas anti-PD-L1 requieren administraciones frecuentes, en dosis altas del fármaco, lo que conlleva altos costos y efectos adversos.⁽⁴⁾ Además, a pesar del éxito clínico del bloqueo del punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 mediante terapia pasiva con anticuerpos, solo un subconjunto de pacientes muestra respuestas duraderas.⁽⁵⁾ En este contexto la inmunoterapia activa abre una vía alentadora para la terapia tumoral dirigida a esta molécula. Los efectos tóxicos relativamente menores y la capacidad de generar una respuesta inmunitaria específica del tumor, combinando mecanismos

efectores de células T tanto humores como citotóxicos, son propiedades deseables para esta estrategia alternativa en comparación con las descritas.

El desarrollo de vacunas contra el cáncer dirigidas a PD-L1 es complejo y desafiante debido a la dificultad de superar la tolerancia inmunológica a las proteínas propias. Se exploran algunas estrategias para desencadenar un efecto inmunológico antitumoral eficaz que involucra respuestas inmunitarias humores y celulares que incluyen: a) una vacuna de ADN PD-L1 administrada por vía oral utilizando un vector bacteriano vivo atenuado de *Salmonella typhimurium*, b) proteínas de fusión del dominio extracelular PD-L1 a un epítipo de célula T nitrado "no propio" formulado en CpG ODN M362 o c) dominio extracelular PD-L1 fusionado al C-terminal del dominio de translocación de la toxina diftérica (DTT) mezclado con adyuvante de Freund. ^(6,7,8)

Las estrategias mencionadas anteriormente demostraron la contribución de ambas ramas de la respuesta inmunitaria a los efectos antitumorales en modelos en ratones. Sin embargo, existen debilidades y elementos importantes que no se cubren por parte de estas investigaciones y que pudieran imposibilitar la traducción exitosa de sus resultados a futuros estudios clínicos. Las respuestas inmunitarias que se inducen con estos candidatos son relativamente moderados, más si se tiene en cuenta que se evalúan en combinación con adyuvantes potentes no aprobados para su empleo en humanos.

Además, se limitan a la evaluación de los candidatos solo en modelos tumorales en ratón, sin incluir especies de animales de experimentación donde la identidad aminoacídica de la molécula autóloga se aproxime más al PD-L1 de humano y donde exista la variabilidad genética que caracteriza a las poblaciones en la naturaleza. Los antecedentes descritos anteriormente, identificaban que no existía una alternativa de inmunoterapia activa que sea capaz de demostrar una ruptura de tolerancia al PD-L1 humano, con efectos inhibitorios sobre el crecimiento del tumor, en presencia de adyuvantes aprobados para uso en la clínica.

En este contexto, se inserta la necesidad de obtener nuevas variantes de inmunización activa dirigida al PD-L1. Este candidato requiere ser diseñado para producir una respuesta inmune dirigida a PD-L1, con el desarrollo de anticuerpos que bloquean la interacción de PD-L1 y sus receptores, así como células T citotóxicas que matan directamente a las células tumorales que producen esta molécula. La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un candidato vacunal basado en una variante estructural del PD-L1 de humanos que, tras su inmunización en animales de experimentación, fuera capaz de inducir una respuesta potente inmunitaria específica con efectos inhibitorios so-

bre el tumor. Además, estudiar los efectores inmunológicos y su efecto sobre el microambiente tumoral.

MÉTODOS

Se trata de un estudio preclínico experimental de desarrollo y evaluación de una vacuna terapéutica (PKPD-L1^{vac}), que incluyó el diseño del antígeno, expresión en *E. coli*, purificación, caracterización fisicoquímica, ensayos de inmunogenicidad en ratones y primates no humanos, así como estudios de actividad antitumoral en modelos murinos singénicos (CT-26 y B16-F10). Todo el trabajo experimental se realizó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba). Los animales fueron adquiridos en el Centro Nacional de Mejoramiento Animal (CENPALAB, La Habana, Cuba) y mantenidos en el bioterio del CIGB. El periodo de ejecución abarcó desde 2017 hasta 2023. El estudio contó con las aprobaciones de los comités de ética institucionales (códigos CICUAL/CIGB/18010, CICUAL/CIGB/18009, para roedores y CICUAL/CIGB/21050 para primates no humanos).

Para realizar la construcción genética del PKPD-L1, se diseñaron 18 oligonucleótidos parcialmente superpuestos y, a partir de ellos, se amplificó el ADN correspondiente a la región madura del dominio extracelular de PD-L1 humano (aminoácidos 19-238). El gen de longitud completa se amplificó, ensambló y clonó en el vector PM238. Este plásmido se utilizó para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes fusionada a los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína *LpdA*. La construcción genética también incluye una cola C-terminal de 6 histidinas para facilitar su purificación. El plásmido con la secuencia de ADN esperada se denominó pPKPDL1.

Para la expresión y purificación por afinidad del PKPD-L1, el antígeno se purificó en una columna Ni-NTA y se eluyó con imidazol 250 mM en PBS (pH 8,0). Se utilizaron columnas de filtración en gel Zetadex para intercambiar el tampón de elución por PBS 1X. La fracción obtenida se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% SDS/PAGE y se estimó el peso molecular mediante HPLC analítico de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200. El peso molecular se estimó utilizando los tiempos de retención, en comparación con un estándar de filtración en gel. Se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para caracterizar las características biofísicas y morfológicas de los agregados de proteínas.

La caracterización funcional del antígeno vacunal se llevó a cabo mediante ensayos de unión a quimeras hPD-1/Fc o hCD80/Fc a través de ELISA. Para ello, las placas se recubrieron con 10 ng/pocillo de quimera PD-1/Fc humana o quimera CD80/Fc humana. Se añadieron diferentes concentraciones

de PKPD-L1 a la placa y se detectaron con un anticuerpo específico conjugado con biotina para PD-L1 humano seguido de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Para comparar la actividad de unión a la proteína PKPD-L1 con una variante biológicamente activa de PD-L1, se utilizaron cantidades molares iguales de una quimera PD-L1/Fc siguiendo las condiciones descritas anteriormente.⁽⁹⁾

Para el desarrollo experimental se emplearon diferentes especies animales y se ejecutó un protocolo de inmunización de acuerdo con la especie. Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 y BALB/c de 6 a 8 semanas de edad; y hembras jóvenes de primates no humanos (NHP) verdes africanos (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) en el CENPALAB. Todos los animales se mantuvieron en el bioterio del CIGB siguiendo las directrices cubanas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Las inmunizaciones con el adyuvante FA se aplicaron cada 14 días, para un total de 4 inmunizaciones. En los ratones se tomaron muestra de sangre el día 49 del estudio, correspondiente a 7 días después de la cuarta inmunización. En el caso de los PNH se tomaron muestra de sangre en 2 momentos del esquema de inmunización: antes de la vacunación (suero preinmune, SPI) y el día 56 del estudio, correspondiente a 14 días después de la cuarta inmunización. En los experimentos de inmunogenecidad se usó el suero para evaluar la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con el candidato vacunal PKPD-L1Vac. El mismo se obtuvo por incubación de la sangre durante 1 h a 37 °C. Luego se incubó a 4 °C por 30 min y se centrifugó a 3824 g durante 15 min a 4 °C. La muestra de suero se conservó a -20 °C hasta su uso.

Para evaluar la respuesta antitumoral en ratones, se retaron ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente, a una inyección subcutánea de 2×10^4 células de melanoma B16-F10 o CT26 alrededor de 5 a 7 días después de la segunda inmunización. Después de la exposición al tumor, se monitoreó periódicamente a los animales y se registraron los días hasta la aparición del tumor, los volúmenes del tumor y la supervivencia. Se sacrificó a los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó los 20 mm de diámetro de acuerdo con los criterios de valoración obligatorios para el cuidado y uso de roedores con tumores inducidos experimentalmente.

Para medir la inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 mediada por suero, se realizó un ensayo de ELISA de competencia. Las placas se recubrieron con 10 ng/pocillo de quimera PD-1/Fc humana. Se mezclaron volúmenes iguales de sueros de ratones inmunizados a una dilución de 1/25 con 50 ng/pocillo de quimera PD-L1/Fc humana y se preincubaron durante 2 h para la formación de complejos inmunes, y luego se agregaron a las placas recubiertas. Después de la formación de complejos inmunes, el PD-L1 libre puede unirse al PD-1 recubierto en

la placa y la unión PD-1/PD-L1 se detecta con un anticuerpo anti-PD-L1 humano biotinilado, seguido de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. La unión máxima de PD-L1 se registró a partir de los valores obtenidos en los pozos en ausencia de suero. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humano disponible comercialmente como control positivo de inhibición. Se realizó un procedimiento similar para evaluar los efectos de los sueros en la interacción CD80/PD-L1. El porcentaje de actividad de inhibición está representado por $100 \% - [(Absorbancia \text{ a } 450 \text{ nm de la muestra de suero} / Absorbancia \text{ a } 450 \text{ nm de unión máxima de PD-L1}) \times 100]$.

Para evaluar la citotoxicidad in vitro en el caso en el caso específico de los ratones BALB/c las células del bazo se activaron in vitro durante 6 días con 10 mg/mL de un conjunto de péptido PD-L1 en el CIGB, La Habana y 10 unidades/mL de IL-2 humana al tercer día. La citotoxicidad directa se evaluó utilizando células tumorales CT-26 marcadas con CFSE en una proporción de 100:1 de células efectoras y diana. Para los ratones C57BL/6, las células del bazo recién aisladas se cocultivaron con células B16-F10 previamente marcadas con CFSE. El número de células tumorales viables (CFSEhi) se registró después de 4 h de cocultivo. El porcentaje de células lisadas se calculó utilizando como referencia las células tumorales cocultivadas con células del bazo aisladas de ratones tratados solo con el adyuvante. Los resultados se expresaron como el porcentaje medio de citotoxicidad encontrado para los animales por grupo para cada condición evaluada.

Para los primates no humanos, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron 14 días después de la última inmunización. Las PBMC que se usarían como dianas se incubaron o no con 10 µg/mL de pool de péptidos PD-L1 (CIGB, La Habana) durante 24 h, y luego se marcaron con CFSE. Posteriormente, estas células se mezclaron con PBMC efectoras autólogas en una proporción de 2:1 y se evaluó la citólisis directa por citometría de flujo, expresada como el porcentaje de reducción de la población marcada con CFSE.

El análisis por citometría de flujo se realizó sobre las células linfoides aisladas de linfonodos drenantes y sobre los linfocitos infiltrantes del tumor CD45+. Estas células se sometieron a inmunotinciones múltiples de superficie con anticuerpos conjugados con fluoróforos específicos para moléculas de ratón: CD3e-FITC, CD4-PE, CD8α-PE-Cy7 y PD1-APC-eFluor780. Las células recuperadas de la selección positiva de células CD45+ se resuspendieron en una solución que contenía la mezcla de anticuerpos para un volumen total de 100 µL en PBS y se incubaron durante 1 h a 4 °C protegido de la luz. Después de 2 lavados en la placa con 250 µL de PBS, el sedimento celular se suspendió en 1 mL de PBS y se adquirió en un citómetro CyFlow Space S (SYSMEX-PARTEC). Para la lectura en el citómetro de

flujo se empleó el programa FlowMax (versión 2.6). Los datos de concentración y frecuencia de la población se analizaron utilizando el software FlowJo (versión 10).

Para el análisis estadísticos todos los datos presentados como diagramas de dispersión o gráficos de líneas se presentaron como media $\pm$ desviación estándar. Los análisis estadísticos entre 2 grupos se realizaron mediante la prueba t de Student, mientras que las comparaciones entre múltiples grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando GraphPad Prism 8. La significación estadística se indicó de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = no significativo. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CIGB (CICUAL), siguiendo las directrices cubanas para el cuidado y uso de animales de laboratorio. En el caso de los primates no humanos (*Chlorocebus aethiops sabaeus*), se siguieron además los estándares de la American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Se aplicaron los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento), utilizando el mínimo número de animales necesarios. Los animales fueron monitorizados diariamente para detectar signos de malestar, dolor o toxicidad. En los experimentos con tumores se establecieron puntos finales obligatorios (eutanasia cuando el diámetro del tumor alcanzaba 20 mm) para minimizar el sufrimiento. Se evaluaron parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histológicos para identificar posibles eventos adversos. Los estudios contaron con los números de aprobación CICUAL/CIGB/18010; CICUAL/CIGB/18009 (ratones) y CICUAL/CIGB/21050 (primates no humanos), lo que garantiza que la investigación se realizó bajo estrictos estándares éticos y de bienestar animal.

RESULTADOS

El antígeno PKPD-L1 se diseñó *in silico* y se obtuvo por vía recombinante en *E. coli*. La amplificación del gen que codifica para la molécula del PD-L1 humano se realizó mediante la técnica de PCR. Se emplearon 18 oligonucleótidos parcialmente sobrelapados que contiene fragmentos del gen que codifica para la secuencia del dominio extracelular del PD-L1 humano. El gen amplificado se purificó y se clonó en el vector de expresión en bacterias pM238 como proteína de fusión a los primeros 47 aminoácidos de la proteína P64K y bajo el control del promotor pTrip (figura 1A).⁽¹⁰⁾ El plásmido positivo para la inserción del gen en cuestión (pPKPD-L1) se determinó mediante secuenciación nucleotídica y se confirmó que este contenía la secuencia correspondiente al dominio extracelular del PD-L1 humano en el programa Vector NTI.⁽⁹⁾

El antígeno PKPD-L1 se expresó en *E. coli* y se purificó fácilmente hasta un 98 % con un único paso de purificación mediante una cromatografía de afinidad iones metálicos (figuras 1B-C). El polipéptido de fusión PKPD-L1 purificado adoptó cambios en su estructura tridimensional que condujeron a la formación de agregados de alto peso molecular (figuras 1D-E). La formación estable de estos agregados da como resultado una variante de PD-L1 con una disposición espacial de varias moléculas de PD-L1 que modifica la estequiometría particular de las interacciones naturales PD-1/PD-L1 o CD80/PD-L1, reduciendo la unión a sus receptores, en comparación con la molécula de PD-L1 nativa.⁽⁹⁾ Estos cambios fueron inducidos intencionalmente para alterar la capacidad protumoral potencial del antígeno (figura 1F).

Para examinar la inmunogenicidad de PKPD-L1^{Vac} se inmunizaron ratones con diferentes fondos genéticos y de MHC clase II (BALB/c (H2-d) y C57BL/6 (H2-b) con 200 μ g del antígeno o del vehículo en combinación con fosfato de aluminio (figura 2A). La administración del polipéptido PKPD-L1, en combinación con fosfato de aluminio, indujo anticuerpos neutralizantes capaces de reconocer la proteína PD-L1 humana biológicamente activa.⁽⁹⁾ Es importante destacar que los cambios estructurales asociados con los agregados de alto peso molecular dentro del antígeno PKPD-L1 no afectaron la capacidad de PKPD-L1 para inducir anticuerpos neutralizantes contra sus receptores naturales PD-L1 o CD80 (figuras 2B, E).

La actividad antitumoral de la vacunación con PKPD-L1^{Vac} se evaluó en 2 modelos de tumores murinos con diferentes niveles de expresión superficial de PD-L1. La línea tumoral murina CT26 tiene niveles de expresión de PD-L1 relativamente bajos y la línea tumoral murina MB16F10 tiene niveles de expresión de PD-L1 altos.⁽⁷⁾ En ambos escenarios, la administración de PKPD-L1^{Vac} afectó la implantación y el crecimiento de los tumores. Además, el tratamiento con el candidato aumentó la supervivencia en los ratones retados con MB16F10 ($p = 0,0497$, prueba de Logrank) o con el tumor CT-26 ($p = 0,0021$ prueba de Logrank) (en comparación con el control negativo (figuras 2D y G)).⁽⁹⁾

El próximo experimento estuvo encaminado a estudiar la distribución de poblaciones linfoides CD3+, CD4+, CD8+ y PD-1 en órganos linfoides secundarios y el tumor, después de la administración del candidato vacunal PKPD-L1^{Vac}. Para ello, ratones de la cepa BALB/c se inmunizaron con PKPD-L1^{Vac} y se retaron con el modelo de carcinoma de colon CT26. A los 33 días después de implantado el tumor, se procedió al sacrificio de los animales y al aislamiento de los linfocitos en los linfonodos drenantes y en el tumor. El enriquecimiento de células CD45+ del tumor CT26 y de los linfocitos de los ganglios linfáticos drenantes se analizó mediante citometría de flujo con anticuerpos conjugados con fluoróforos contra CD3+, CD4+,

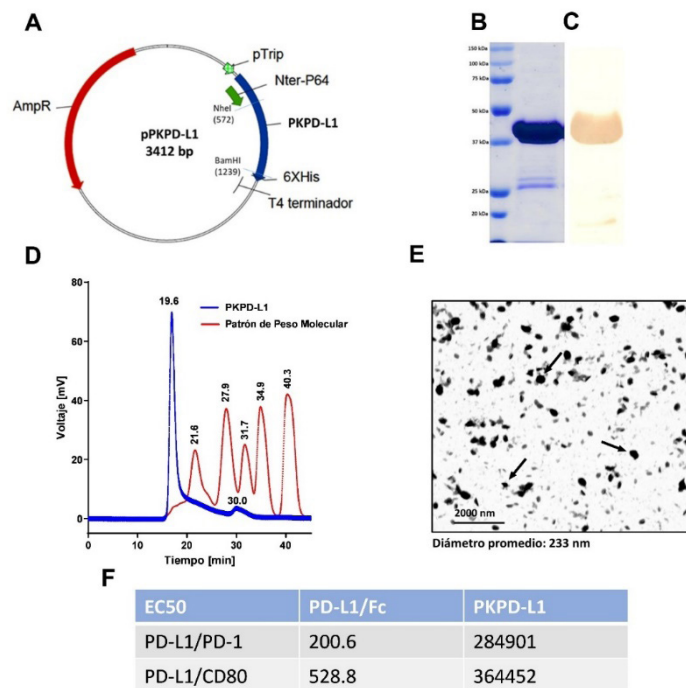


Fig. 1. Clonaje, purificación y caracterización de la proteína PKPD-L1; A) diagrama de la inserción del gen que codifica para la proteína PKPD-L1 en el vector de expresión pM238; B) electroforesis de proteínas en gel de poliácridamida al 12 % (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Carril PM: Patrón de peso molecular mostrado a la izquierda los valores en kDa de las diferentes proteínas de arriba hacia abajo: (miosina, β -galactosidasa, BSA, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soja y lisozima); carril 1: proteína PKPD-L1 purificada; C) inmunodetección mediante Western blotting con un anticuerpo policlonal de carnero conjugado a biotina específico al PD-L1; D) cromatograma representativo de la proteína en Tris 40mM, pH 7,4 (línea azul) usando una columna Superdex 200; 0,5 mL/min. La línea roja representa al patrón de peso molecular compuesto por tiroglobulina 670 kDa, γ -globulina 158 kDa, ovoalbúmina 44 kDa, mioglobina 17 kDa y vitamina B12 1,350 kDa de izquierda a derecha. Los valores mostrados en cada uno de los picos se corresponden a los tiempos de retención; E) microfotografía representativa de la microscopía electrónica de transmisión que se realizó al producto final del PKPD-L1. Se empleó una magnificación entre 18X a 19X aumentos y una barra de 2000nm de diámetro para la cuantificación de los agregados proteicos. Se detectan partículas de aproximadamente 200 nm y 300 nm de diámetro (se señalan con flechas); F) valores de EC 50 de la interacción de PKPD-L1 y PD-L1/Fc con los receptores PD-1 y CD80.

CD8+ y PD-1. En los ganglios linfáticos drenantes, la inmunización con PKPD-L1^{Vac} aumentó significativamente el número de células T CD3+, CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en comparación con los de los ratones del grupo control negativo ($p < 0,05$) (figuras 3A, 3B y 3C). Dentro del tumor, se detectaron tendencias crecientes de estas poblaciones de células T en el grupo de ratones vacunados con PKPD-L1^{Vac} (figuras 3E, 3F y 3G). Además, se estudiaron las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ con los niveles más altos del receptor de membrana PD-1 (PD-1^{High}) como indicador de un fenotipo de células T afectadas negativamente desde el punto de vista funcional. En los ganglios linfáticos drenantes y los linfocitos infiltrantes de tumores, la inmunización con PKPD-L1^{Vac} disminuye significativamente los niveles de expresión del receptor PD-1 en las poblaciones de células T (figuras 3D y H). La regulación negativa de la expresión de la proteína PD-1 en las membranas de las células T impide recibir la señal de desactivación a

través de la interacción con PD-L1 y por tanto se encuentren en un fenotipo activado. Por tanto, la inmunización con el candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} genera una respuesta inmunitaria que trae consigo el incremento y la restauración potencial de la activación de las células T dentro del microambiente tumoral y en órganos linfoides. ⁽⁹⁾

Los primates no humanos constituyen un invaluable modelo animal en las investigaciones de vacuna para cáncer, que nos permite entender mejor los fenómenos biológicos en el desarrollo de tratamientos para esta condición. Los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad del candidato PKPD-L1Vac en esta especie demostraron la inducción de una respuesta de anticuerpos específica para la molécula del PD-L1 humana con capacidad de inhibir las interacciones con el receptor PD-1 (figuras 4 A y B). Además, se detectó la inducción de una respuesta inmunitaria celular. Las PBMC de primates obtenidas los días 0 y 56 se incubaron con una

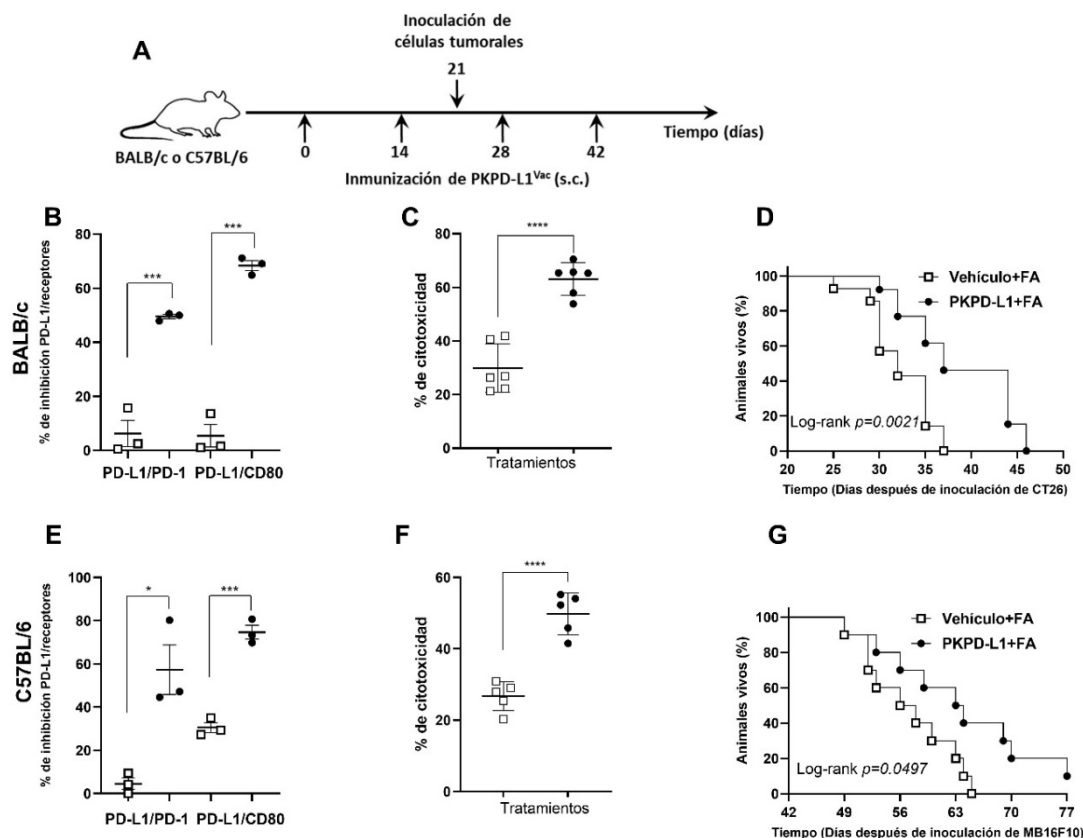


Fig 2. La inmunización con PKPD-L1Vac induce respuestas inmunitarias celulares y humorales específicas anti-PD-L1 con un aumento significativo de la supervivencia en ratones retados con células de cáncer de melanoma colorrectal CT26 o B16-F10; A) los ratones se inmunizaron con el antígeno PKPD-L1 o el vehículo en combinación con fosfato de aluminio y el inmunógeno se administró 4 veces a intervalos de 2 semanas. Una semana después de la segunda inmunización, los animales se retaron por vía subcutánea con las células tumorales. Después de 7 días de la cuarta inmunización se extrajeron sueros y los esplenocitos; B) actividad de bloqueo del suero en las interacciones de PD-L1 con los receptores PD-1 y CD80 en BALB/c y C57BL/6; C) Citotoxicidad celular directa de células del bazo de ratones BALB/c y (F) C57BL/6 inmunizados con PKPD-L1^{Vac} contra células tumorales CT-26 y MB16-F10, respectivamente; D y G) porcentaje de animales vivos (supervivencia). Los valores de p se calcularon de acuerdo con la prueba t no pareada (figuras B, C, E y F). En el caso de supervivencia (figuras D y G) se calcularon según la prueba de **Log-rank**. Se consideró significación estadística una $p < 0,05$.

mezcla de péptidos del PD-L1 (figura 4D); 2 de los 3 animales del grupo mostraron actividad citotóxica específica. Estos resultados fueron corroborados mediante una prueba de ELISPOT de secreción de IFN- γ (figura 4E), lo que sugiere que la respuesta celular inducida por a la inmunización con el candidato es mediada por clones de células T específica al PD-L1 humano secretores de IFN- γ . (9) Estas evidencias constituyen un aspecto importante en el camino de lograr la mejor aproximación vacunal para la extensión de estos resultados a la práctica clínica. Los resultados obtenidos en primates constituyen la primera demostración en un modelo cercano al humano de la validez de la hipótesis de que es posible romper la tolerancia B y T contra el PD-L1, empleando una vacuna con antígeno humano.

DISCUSIÓN

El presente trabajo recoge los primeros estudios y evaluaciones en Cuba de un nuevo candidato para la inmunoterapia activa basado en el dominio extracelular de la molécula del PD-L1 humano. Varios aspectos se tuvieron en consideración para el desarrollo del novedoso candidato vacunal, para hacerlo ventajoso en términos de su producción, seguridad y para satisfacer las limitaciones de otras alternativas que se encuentran en el estado del arte.

En la literatura varios autores apuestan por la selección de variantes modificadas de diferentes inmunógenos con el objetivo de modular su toxicidad, afectar su capacidad inmunosupresora o inactivar la actividad protumoral. ^(11,12,13) En este trabajo se decidió mantener la secuencia sin adicionar muta-

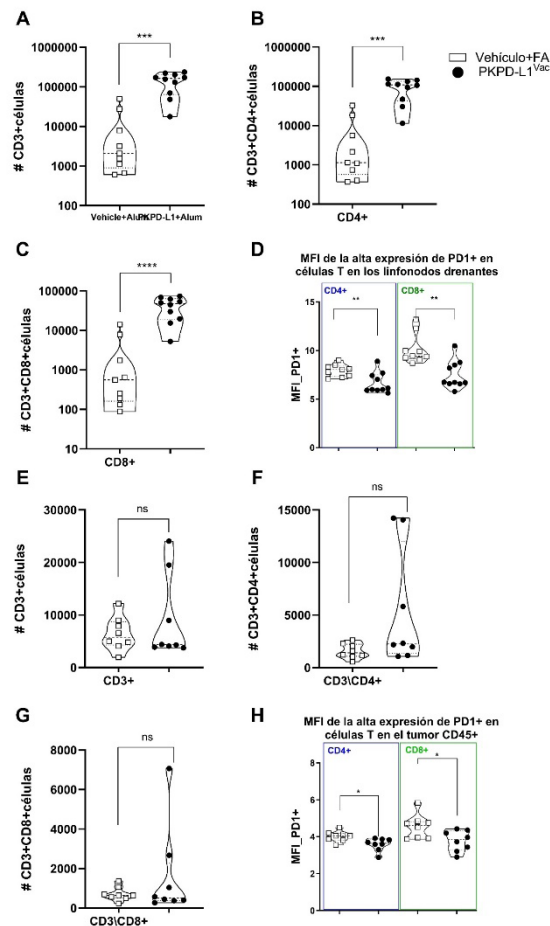


Fig. 3. Subpoblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y PD1 en linfonodos y en el tumor; A, B y C) número de células T CD3+, CD4+ y CD8+ en los ganglios linfáticos de drenaje, respectivamente. D) MFI de población de células T PD-1+ alta de ganglios linfáticos de drenaje. E, F y G) número de células T CD3+, CD4+ y CD8+ del tumor CD45+. H) MFI de población de células T PD-1+ alta de células tumorales CD45+ seleccionadas. Prueba no pareada t de Student, ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

ciones, pero se partió del diseño de una construcción genética y un método de purificación mediante el cual la molécula adoptara conformaciones que difirieran de la estructura de la molécula nativa. La quimera PKPD-L1 obtenida a partir de la construcción genética anteriormente mencionada se produce en cuerpos de inclusión, y su purificación en condiciones desnaturizantes puede favorecer que la proteína adopte una estructura conformacional diferente a la molécula nativa no descrita para otros candidatos vacunales basados en el PD-L1. En las preparaciones de agregados del antígeno varias moléculas de PD-L1 adoptan una disposición espacial que modifica la estequiometría particular de las interacciones naturales PD-1/PD-L1 o CD80/PD-L1, que reduce la unión a sus receptores en comparación con un PD-L1 biológicamente activo. Una molécula con estas características podría tener un limitado potencial protumoral, de modo que

se reducen así posibles objeciones regulatorias en el desarrollo futuro de este candidato a vacuna en humanos.

En el estudio actual el antígeno PKPD-L1 se obtiene de un complejo estable compuesto por multímeros, que tiene una morfología de partículas. Esta agregación de moléculas no nativas podría conducir a la exposición repetida de epítopos y podría favorecer la exposición de determinantes antigénicos crípticos (ocultos por el pliegue nativo). Otros autores demuestran que la agregación o la formación de partículas de un antígeno podría aumentar su inmunogenicidad general al mejorar el entrecruzamiento del receptor de células B, lo que conduce a niveles más altos de activación de estas células y al direccionamiento del antígeno internalizado hacia los lisosomas con la subsiguiente mejoría en la presentación de antígeno a las células T. ^(14,15) Por consiguiente, las propiedades inmunogénicas del an-

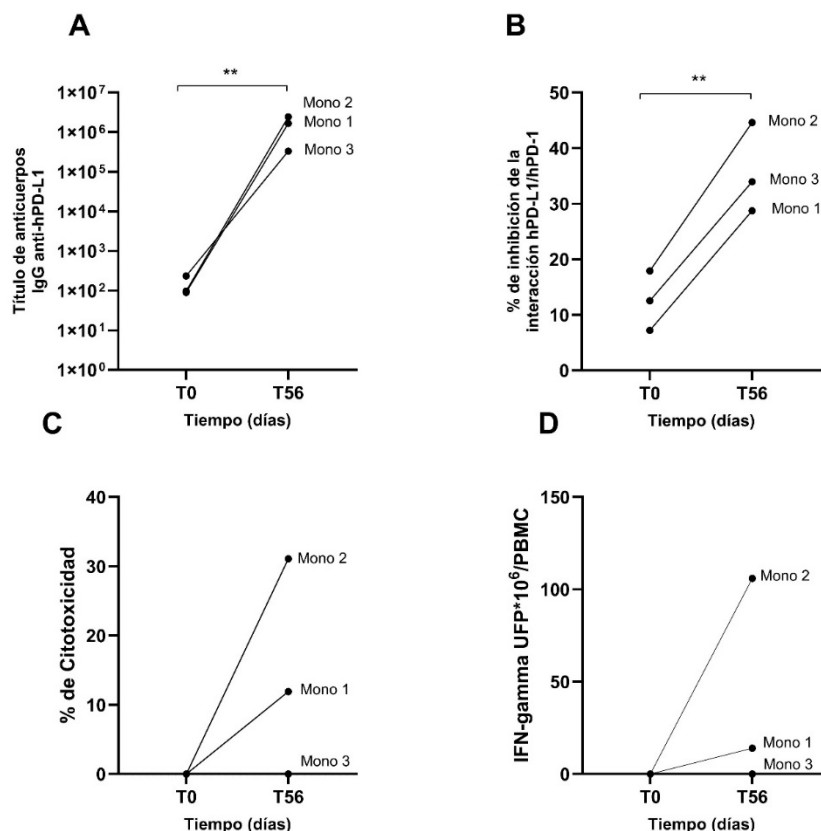


Fig. 4. Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral y celular T en primates no humanos inmunizados con PKPD-L1Vac; A) títulos de anticuerpos IgG contra el PD-L1 humano en monos, los días 0 y 56 del estudio. B) inhibición de la interacción PD-L1 con el receptor PD-1 por el suero de los monos inmunizados con PKPD-L1 (3 réplicas para cada muestra). La significación estadística se representa en el gráfico como: $**p < 0,01$ de acuerdo a la prueba t de Student pareada (calculado a partir de los valores de DO con respecto a los valores de este parámetro antes del tratamiento); C) el porcentaje de citotoxicidad de los linfocitos de monos inmunizados con PKPD-L1Vac sobre las células autólogas cargadas con una mezcla de 7 péptidos de PD-L1 humano; D) gráfico de media de unidades formadoras de puntos de IFN- γ (UFP 1×10^6 /PBMC) respondedoras después de 24 h de estimulación ($n = 3$). Se realizaron comparaciones pareadas entre los días 0 y 56 mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

tígeno vacunal PKPD-L1 podrían verse favorecidas por la agregación y la adopción de una conformación particulada del polipéptido de fusión.

El otro elemento a tener en cuenta, fue la selección de un adyuvante que permitiera la inducción de una respuesta inmunitaria elevada y de larga duración contra el antígeno. Aunque numerosas formulaciones están descritas en el estado del arte, los requisitos de seguridad de las vacunas aún son un gran desafío y solo los compuestos de aluminio están aprobados para su uso en seres humanos. ⁽¹⁶⁾ Varios informes muestran que las sales de aluminio pueden inducir respuestas sostenidas de células B específicas al antígeno. Sin embargo, combinado con antígenos particulados, este adyuvante podría inducir respuestas inmunitarias celulares y de tipo Th1 que potencian la respuesta antitumoral. ^(11,17)

De esta forma un reto de este trabajo fue evidenciar en el contexto de este adyuvante, si se podía obtener una respuesta inmunitaria humoral y celular específica al PD-L1. La formulación del antígeno PKPD-L1 con el adyuvante fosfato de aluminio se decidió denominarla como PKPD-L1^{Vac}.

Los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad del candidato PKPD-L1^{Vac} en ratones demostraron la inducción de una respuesta de anticuerpos específica para la proteína PD-L1 humana y para la versión murina de este ligando. El hecho de que las moléculas de PD-L1 humana y de ratón compartan una identidad de aminoácidos del 77 % puede explicar la mayor respuesta observada hacia la molécula heteróloga en comparación con la contraparte de ratón en ambas cepas. ⁽¹⁸⁾ Adicionalmente se demostró la inducción de anticuerpos específicos al PD-L1 en ratones BALB/c

portadores de tumor CT26. Esta evidencia sugiere que este candidato es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica en el contexto de un tumor.

Adicionalmente los anticuerpos inducidos con la inmunización con el candidato vacunal mostraron la capacidad de inhibir las interacciones de la molécula PD-L1 con sus receptores naturales: PD-1 y CD80. En contraste, otras estrategias de vacunas dirigidas contra la molécula solo demuestran la inhibición de la unión al receptor PD-1. ^(7,8) Sin embargo, los resultados de las terapias pasivas con los anticuerpos que se encuentran en la clínica indican la relevancia de inhibir ambos receptores. ⁽⁵⁾ La inmunosupresión que induce el tumor dentro del microambiente tumoral implica la interacción del PD-L1 con el PD-1, pero también involucra a la unión con el CD80. ⁽¹⁹⁾ El PD-L1, presente en la superficie de la célula tumoral, interactúa con los receptores PD-1 o CD80, sobre las células T y conduce a la disfuncionalidad de estas células, por lo que inhibir ambas interacciones pudiera propiciar un mayor efecto antitumoral. Es relevante destacar que, aunque el antígeno PKPD-L1 presenta cambios estructurales importantes, no se afectó la inducción de una respuesta a anticuerpos neutralizantes. Esto indica que la actividad de bloqueo probablemente se deba en mayor parte a un impedimento estérico, y no a una competencia por los determinantes críticos involucrados en el sitio de unión del PD-L1 con ambos receptores.

Además de la respuesta humoral, otra de las ventajas que presenta la inmunoterapia activa específica es la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo celular. La estrategia activa, a diferencia de la pasiva, podría aportar un mayor efecto antitumoral debido a la inducción de linfocitos citotóxicos específicos capaces de lisar células tumorales. En este documento, se muestran evidencias de que la inmunización de ratones con el candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} generó una respuesta de linfocitos específicos con actividad CTL en células tumorales singénicas que expresan el PD-L1 murino. Estos linfocitos, a través de su receptor de células T, podrían reconocer y destruir las células tumorales que expresan epítomos de PD-L1 en el contexto del MHC clase I.

Una vez que se evidenciaron los efectos inmunológicos inducidos por la inmunización con el candidato PKPD-L1^{Vac}, se procedió a evaluar si estos efectores pudieran ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tumores implantados en ratones inmunocompetentes. La inmunización con el candidato PKPD-L1^{Vac} mostró un efecto negativo sobre el crecimiento tumoral e incrementó la supervivencia en los animales inmunizados con respecto a los animales tratados solo con el adyuvante en un modelo de melanoma de alta agresividad (B16F10) y sobre el tumor primario CT26. En particular, los resultados del candidato sobre el modelo de carcinoma de

colon CT26 indican que se puede lograr un efecto antitumoral en tumores con menor expresión de PD-L1. Tian y colaboradores obtuvieron resultados similares con el candidato vacunal PDL1-NitraTh. ⁽⁷⁾ Los autores plantearon la hipótesis de que, dado que las células tumorales pueden producir resistencia inmunitaria adaptativa mediante la regulación de PD-L1 dependiente de IFN- γ , la vacuna podría inhibir el crecimiento de células tumorales con baja expresión de PD-L1. Se podría aplicar un concepto similar para PKPD-L1^{Vac} convirtiendo este mecanismo de escape inmunitario en activación inmunitaria.

En los ratones BALB/c, retados con el carcinoma de colon CT26 singénico y tratados con el candidato PKPD-L1^{Vac}, se incrementó el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ en los linfonodos drenantes. La evaluación de la expresión de membrana de PD-1 en estas poblaciones indicó una reducción significativa de este marcador tanto en los linfonodos drenantes como en el tumor. La regulación negativa de la expresión de la proteína PD-1 en las membranas de las células T impide recibir la señal de desactivación a través de la interacción con PD-L1 y por tanto se encuentren en un fenotipo activado. Por tanto, la inmunización con el candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} genera una respuesta inmunitaria que trae consigo el incremento y la restauración potencial de la activación de las células T dentro del microambiente tumoral y en órganos linfoides.

En el presente trabajo una vez que se demostró el principio de la inducción de un efecto anti-tumoral de la inmunización con el candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} en ratones, se propuso estudiar si este candidato podía activar la respuesta inmunitaria responsable del efecto antitumoral en primates no humanos. Con este objetivo, se evaluó la inmunogenicidad de la administración del candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} en la especie *Chlorocebus aethiops sabaeus*, en los que la identidad aminoácidica del PD-L1 humano es de un 96 % (UniProtKB: Q9NZQ7; A0A-0D9R951). Los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad del candidato PKPD-L1^{Vac} en esta especie demostraron la inducción de una respuesta de anticuerpos específica para la molécula del PD-L1 humana con capacidad de inhibir las interacciones con el receptor PD-1. Además, se detectó la inducción de una respuesta inmunitaria celular mediada por clones de células T específica al PD-L1 humano secretores de IFN- γ . Estas evidencias constituyen un aspecto importante en el camino de lograr la mejor aproximación vacunal para la extensión de estos resultados a la práctica clínica.

La figura 5 incluye la propuesta de un modelo que incluye los principales elementos relacionados con el mecanismo de este novedoso candidato. El candidato vacunal PKPD-L1^{Vac} induce una respuesta inmunitaria adaptativa específica al PD-L1. Varios elementos asociados a la respuesta inmunitaria de este candidato vacunal pudieran estar implicados en

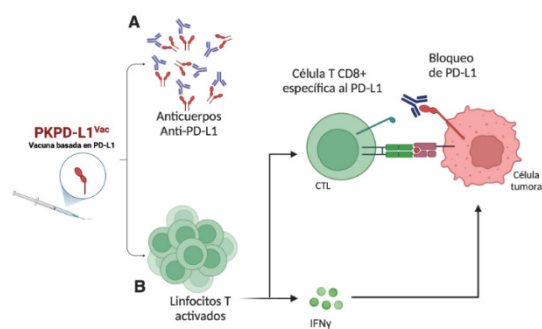


Fig. 5. Modelo teórico del mecanismo de acción del PKPD-L1Vac. La inmunización con PKPD-L1Vac induce: A. Una respuesta de anticuerpos específicos y neutralizantes del PD-L1 que interfiere con las funciones del ligando en el rescate de la apoptosis del tumor, bloquea los efectos inmunosupresores del PD-L1 relacionados con la inhibición de la maduración de CD y de la activación de linfocitos T, con la inducción de MSDC y el reclutamiento de Treg. B. Una respuesta CTL contra las células tumorales que expresan el PD-L1 y que presentan en el contexto de su MHC los péptidos correspondientes. Fuente: creada mediante el programa BioRender, López, A. (2024), <https://BioRender.com/n71p082>

un posible mecanismo general de su impacto en la terapia del cáncer. Por una parte, los anticuerpos inducidos por la inmunización pueden neutralizar el PD-L1 expresado en las células tumorales, lo que puede interferir con las funciones de esta molécula en el rescate de la apoptosis del tumor. Los anticuerpos específicos al PD-L1, pudieran tener también un impacto en el bloqueo de los efectos inmunosupresores del PD-L1 relacionados con la inhibición de la maduración de las CD y de la activación de linfocitos T, y con la inducción de MSDC y el reclutamiento de Treg. Por otra parte, la inducción de una respuesta CTL puede conducir a la destrucción de las células tumorales que expresan el PD-L1 y que presentan en el contexto de su MHC los péptidos correspondientes. La mayoría de los tumores expresan el PD-L1 y, por tanto, constituyen blancos potenciales de la actividad citotóxica de los CTL. La posibilidad de inducir, de una manera directa, la muerte por apoptosis de las células tumorales, convierte al PKPD-L1^{Vac} en una inmunoterapia con potencialidades de provocar efectos inhibitorios sobre el crecimiento y el desarrollo de los tumores.

Conclusiones

De conjunto estos resultados sugieren que el PD-L1 pudiera ser un blanco eficaz para la inmunoterapia activa de los tumores y no se descarta su empleo en otras patologías que cursen con un aumento en la expresión de este ligando. Los resultados obtenidos permiten definir un preparado vacunal específico, donde la variante del PD-L1 se mezcla con el adyuvante

fosfato de aluminio. En resumen, la vacuna PKPD-L1^{Vac} demuestra resultados preclínicos muy alentadores que avallan el desarrollo futuro de un ensayo clínico de fase I.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. [Internet] 2012 [citado 1 abr 2026];12(10):2575-87. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x>
2. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, *et al.* The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. Frontiers in Immunology. [Internet] 2019 [citado 1 abr 2026];10(2298). Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02298>
3. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. The AAPS Journal. [Internet] 2021;23(2):39. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00574-0>
4. Makuku R, Khalili N. Current and Future Perspectives of PD-1/PDL-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. [Internet] 2021;2021:6661406. [citado abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/6661406>
5. Ai L, Chen J, Yan H, He Q, Luo P, Xu Z, *et al.* Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. Drug Des Devel Ther. [Internet] 2020;14:3625-49. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.2147/dddt.s267433>
6. Wieckowski S, Smetak H, Kobl I, Podola L, Nugues A-L, Slos P, *et al.* Live attenuated oral Salmonella platform for effective T- and B-cell targeting of PD-L1. Journal of Clinical Oncology. [Internet] 2018;36(5_suppl):74. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.5_suppl.74

7. Tian H, Kang Y, Song X, Xu Y, Chen H, Gong X, *et al.* PDL1-targeted vaccine exhibits potent antitumor activity by simultaneously blocking PD1/PDL1 pathway and activating PDL1-specific immune responses. *Cancer Lett.* [Internet] 2020;476:170-82. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.024>
8. Lin Z, Zhang Y, Cai H, Zhou F, Gao H, Deng L, *et al.* A PD-L1-Based Cancer Vaccine Elicits Antitumor Immunity in a Mouse Melanoma Model. *Molecular therapy oncolytics.* [Internet] 2019;14:222-32. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.06.002>
9. Morera-Díaz Y, Canaan-Haden C, Sanchez-Ramirez J, Bequet-Romero M, Gonzalez-Moya I, Martinez R, *et al.* Active immunization with a structurally aggregated PD-L1 antigen breaks T and B immune tolerance in non-human primates and exhibits *in vivo* anti-tumoral effects in immunocompetent mouse tumor models. *Cancer Lett.* [Internet] 2023;561:216156. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216156>
10. Yero D, Pajón R, Niebla O, Sardíñas G, Vivar I, Perera Y, *et al.* Bicistronic expression plasmid for the rapid production of recombinant fused proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry.* [Internet] 2006;44(Pt 1):27-34. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/ba20050170>
11. Morera-Díaz Y, Gavilondo JV, Bequet-Romero M, Sánchez Ramírez J, Hernández-Bernal F, Selman-Housein KH, *et al.* Specific active immunotherapy with the HEBERSaVax VEGF-based cancer vaccine: From bench to bedside. *Seminars in oncology.* [Internet] 2018;45(1-2):68-74. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.03.004>
12. Carmenate T, Montalvo G, Lozada SL, Rodríguez Y, Ortiz Y, Díaz C, *et al.* The antitumor effect induced by an IL-2 'no-alpha' mutein depends on changes in the CD8+ T lymphocyte/Treg cell balance. *Frontiers in Immunology.* [Internet] 2022;13. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.974188>
13. Radaelli A, De Giuli Morghen C, Zanutto C, Pacchioni S, Bissa M, Franconi R, *et al.* A prime/boost strategy by DNA/fowlpox recombinants expressing a mutant E7 protein for the immunotherapy of HPV-associated cancers. *Virus research.* [Internet] 2012;170(1-2):44-52. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.007>
14. Ilyinskii PO, Thoidis G, Sherman MY, Shneider A. Adjuvant potential of aggregate-forming polyglutamine domains. *Vaccine.* [Internet] 2008;26(26):3223-6. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.078>
15. Snapper CM. Distinct Immunologic Properties of Soluble Versus Particulate Antigens. *Frontiers in Immunology.* [Internet] 2018;9. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00598>
16. HogenEsch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines.* [Internet] 2018;3(1):51. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>
17. Perez Sanchez L, Morera Diaz Y, Bequet-Romero M, Ramses Hernandez G, Rodriguez Y, Castro Velazco J, *et al.* Experimental studies of a vaccine formulation of recombinant human VEGF antigen with aluminum phosphate. *Human vaccines & immunotherapeutics.* 2015;11(8):2030-7. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1029213>
18. Pascolutti R, Sun X, Kao J, Maute RL, Ring AM, Bowman GR, *et al.* Structure and Dynamics of PD-L1 and an Ultra-High-Affinity PD-1 Receptor Mutant. *Structure (London, England: 1993).* [Internet] 2016;24(10):1719-28. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.026>
19. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* [Internet] 2007;27(1):111-22. [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.016>
20. López A. Creación de figura mediante BioRender [Internet]. BioRender; [Internet] 2024 [citado 1 abr 2026]. Disponible en: <https://BioRender.com/n71p082>

Recibido: 29/04/2026

Aprobado: 12/05/2026

Agradecimientos

La presente investigación es también el resultado de la contribución y apoyo de Sonia González Blanco, Luis Ariel Espinosa Rodríguez, Vladimir Besada Pérez, Dasha Fuentes, Aileen Batte, Pedro Puente Pérez, Dagmara Pichardo Díaz, Dioslaida Urquiza Noa, Jorge Castro Velazco, Olivia Cabanillas Bernal.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos, ni con la investigación presentada, ni con la institución que representa.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Yanelys Morera Díaz, Jorge V. Gavilondo Cowley
- Curación de datos: Jorge V. Gavilondo Cowley, Marta Ayala
- Análisis formal: Yanelys Morera Díaz, Camila Canaán-Haden Ayala, Javier Sánchez Ramírez
- Adquisición de fondos: Miladys Limonta Fernández, Marta Ayala Ávila
- Investigación: Camila Canaán-Haden Ayala, Yanelys Morera Díaz, Javier Sánchez Ramírez, Mónica Bequet Romero, Isabel Gonzales, Daniela Palenzuela, Viviana Falcón, Rafael Martínez Castillo
- Metodología: Yanelys Morera Díaz, Camila Canaán-Haden Ayala
- Administración del proyecto: Yanelys Morera, Jorge V. Gavilondo Cowley, Marta Ayala Ávila
- Recursos: Miladys Limonta Fernández
- Supervisión: Marta Ayala Ávila
- Redacción-borrador original: Yanelys Morera Díaz, Camila Canaán-Haden Ayala
- Redacción-revisión y edición: Javier Sanchez, Ayala, Marta Ayala Ávila

Financiamientos

La presente investigación fue financiada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Cómo citar este artículo

Canaán-Haden Ayala C, Sánchez Ramírez J, Bequet Romero M, Gonzalez-Moya I, Martínez Castillo R, **et al.** Inmunoterapia activa con una variante estructural del ligando 1 del receptor de muerte programada 1. An Acad Cienc Cuba [Internet] 2026 [citado en día, mes y año];16:e3263. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/3263>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial). © Los autores, 2026.





