



**FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

**APLICACIÓN DE LA  
NANOTECNOLOGÍA EN  
INMUNOTERAPIA CONTRA EL  
CÁNCER**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2017

**Autor:** Andrea Sirera Pérez

**Modalidad:** Revisión bibliográfica

**Tutor/es:** Enrique Barraón Catalán

## **ÍNDICE**

<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>4</b>
1. <b>Cáncer .....</b>	<b>4</b>
2. <b>Sistema inmunitario .....</b>	<b>5</b>
3. <b>Inmunoterapia del cáncer .....</b>	<b>7</b>
4. <b>Nanomedicina en inmunoterapia .....</b>	<b>9</b>
5. <b>Modulación del microambiente tumoral mediante nanopartículas .....</b>	<b>9</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>11</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>23</b>
Dirigido a puntos de control inmunitarios.....	30
Dirigido a mediadores celulares .....	31
Dirigidos a mediadores solubles .....	31
<b>Conclusión .....</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>32</b>

## Resumen

El sistema inmunitario es un factor esencial para combatir los tumores, por ello, la inmunoterapia tiene un gran potencial en el tratamiento del cáncer, aunque también presenta inconvenientes.

Una de las estrategias emergentes es la actuación sobre el microambiente tumoral, el cual es el conjunto de células, vasos sanguíneos y moléculas que se encuentran alrededor del tumor y favorecen su crecimiento. Cambiando este microambiente se puede conseguir una mayor tasa de respuesta en las terapias antitumorales.

En esta revisión bibliográfica realizada mediante la búsqueda en bases de datos, libros y paginas web, se analiza el uso de las nanopartículas para la remodelación del microambiente tumoral, con el fin de conseguir una mayor respuesta inmunitaria ante distintos tratamientos. Los estudios seleccionados muestran en su mayoría una activación del sistema inmunitario y una mayor tasa de respuesta ante distintas terapias, al cambiar el microambiente tumoral. Este enfoque terapéutico tiene grandes ventajas y podría ser utilizado en futuras terapias, aunque hasta el momento se encuentra en fase preclínica solo probada en modelos animales y se desconoce su eficacia en humanos.



## Abstrat

The immune system is an essential factor in fighting tumors, therefore immunotherapy has great potential in the treatment of cancer, although it also has disadvantages.

One of the emerging strategies is acting on the tumor microenvironment, which is the set of cells, blood vessels and molecules that are around the tumor and favor its growth. By changing this microenvironment, a higher response rate can be achieved in antitumor therapies.

In this bibliographic review carried out by searching databases, books and web pages, the use of nanoparticles for the remodeling of the tumor microenvironment is analyzed, in order to achieve a greater immune response to different treatments. The selected studies mostly show an activation of the immune system and a higher response rate to different therapies, by changing the tumor microenvironment. This therapeutic approach has great advantages and could be used in future therapies, although so far it is in the preclinical phase, only tested in animal models and its efficacy in humans is unknown.

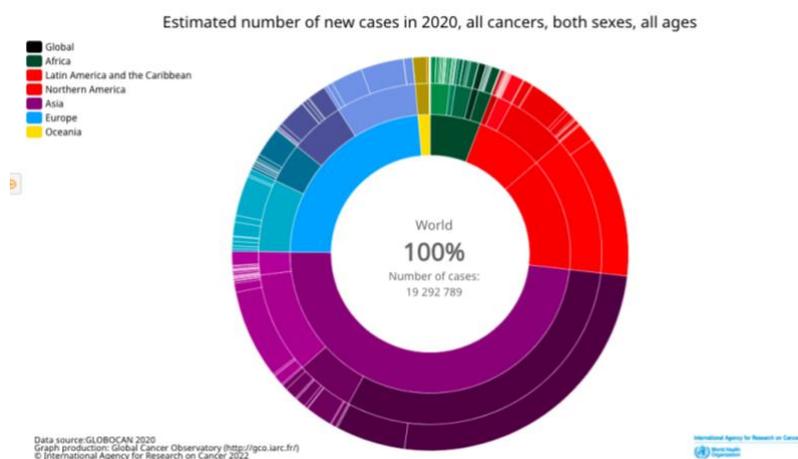
## Introducción

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un análisis en base a artículos que tratan sobre como se aplica la nanotecnología para la mejora de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. A lo largo del documento, se tratarán algunas cuestiones relativas al cáncer, el sistema inmunitario, la inmunoterapia en el cáncer y la nanotecnología aplicada en la inmunoterapia que se especifican a continuación.

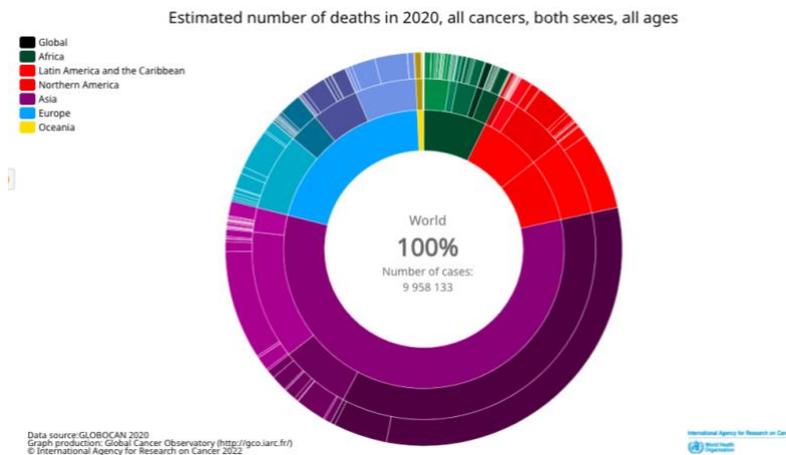
### 1. Cáncer

El termino cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades, las cuales se identifican por un crecimiento descontrolado de células anormales (1).

Se trata de una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Según el Observatorio Mundial del Cáncer (GCO) se estima que en 2020 hubo aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo (figura 1)(2) y cerca de 10 millones de muertes (figura 2)(3).



**Figura 1.** Estimación mundial de nuevos casos de cáncer según los continentes representados por el círculo interior, el círculo central equivale a el sur, norte, este y oeste de los continentes y la circunferencia exterior representa los países, sin distinguir entre sexo ni edad (2).



**Figura 2.** Estimación de muertes en el mundo por cáncer dividido en continentes, en ambos sexos y en todas las edades (3).

## 2. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario se puede dividir en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se caracteriza por ser una respuesta rápida pero poco específica, ya que, esta compuesta por un sistema de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares de microorganismos (PAMP) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMP). Las células inmunitarias asociadas a la inmunidad innata son los granulocitos, monocitos y macrófagos, células linfoides innatas, células dendríticas, células NK, células NKT y linfocitos T  $\gamma\delta$  (4). Por otro lado, la inmunidad adaptativa presenta una respuesta lenta pero más específica que consiste en el reconocimiento de antígenos específicos mediante receptores, debido a la amplia diversidad de estos receptores se hace posible que sean capaces de identificar pequeños cambios en el antígeno. Sin embargo, ante un microorganismo con el que anteriormente se ha tenido contacto, la respuesta será rápida e intensa debido a que se han generado células memoria. Un antígeno es en su mayoría proteínas o ácidos nucleicos, lípidos y otras sustancias asociados con unas proteínas capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria (4,5). Las células de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y los linfocitos B (5).

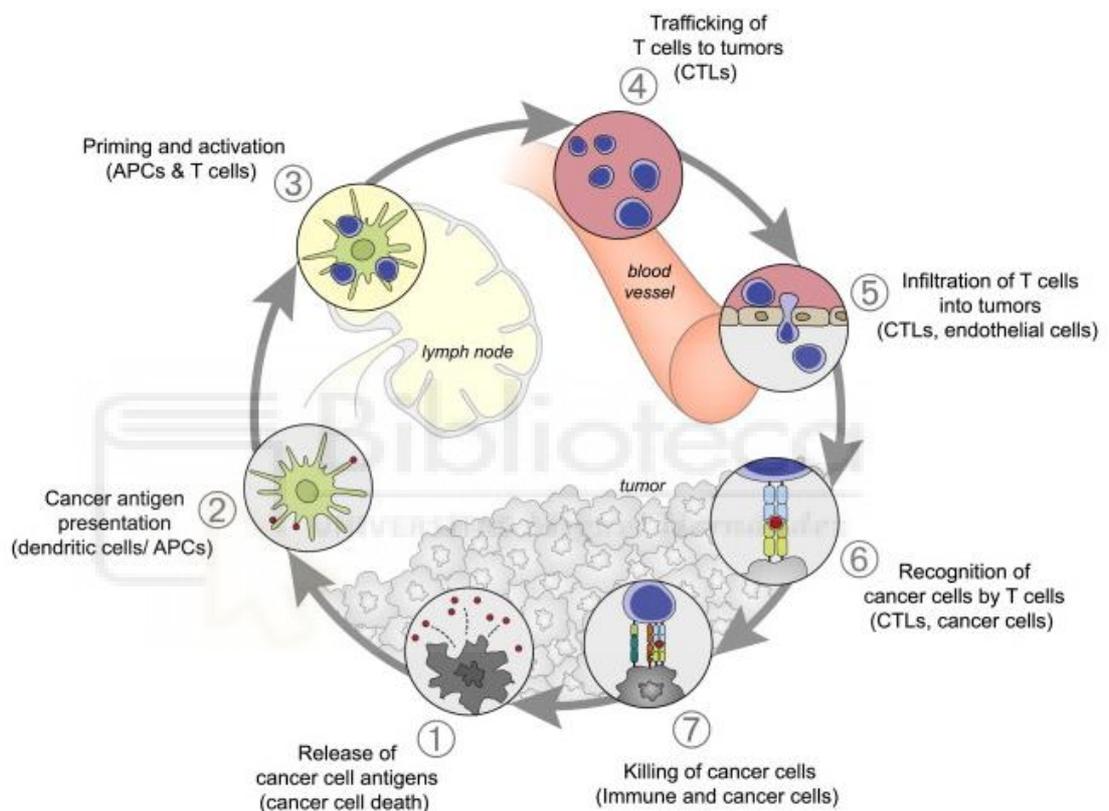
En 1957 nace la teoría de la inmunovigilancia antitumoral de la mano de Thomas y Burnet, en ella proponen que el sistema inmunitario se encuentra en un estado de alerta constante teniendo la capacidad de reconocer y eliminar las células tumorales. Pero no fue hasta finales del siglo XX, cuando los ensayos de Schreiber y Old demostraron que existía una clara respuesta del sistema inmunitario ante el cáncer (6).

Esta respuesta inmunitaria ante el desarrollo de un tumor (Figura 3), se da cuando dicho tumor esta produciendo un daño en el tejido circundante y ello envía una señal de peligro. Pero hay casos en los que el tumor no genera la señal de peligro, desarrollándose de manera silenciosa sin ser detectado por el sistema inmune.

Tras esta señal de peligro las células NK y NKT que han acudido al tejido dañado se encargan de eliminar algunas células tumorales produciéndose una liberación de antígenos asociados a tumores (TAAs), estos TAAs van a ser procesados por las células dendríticas (CD) y presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I)

y II (MHC-II). Después, estas CD migran hasta los ganglios linfáticos donde van a presentar los TAAs a los linfocitos T CD4+ y CD8+. Más tarde, los linfocitos CD8+ naive se convierten en verdaderos linfocitos citotóxicos (CTL) que van a viajar a través de los vasos sanguíneos hasta infiltrarse en el tumor. Una vez ahí, los CTL reconocerán los TAAs y serán activados por los receptores de las células T (TCR) comenzando la eliminación de las células tumorales, lo que produce la liberación de antígenos, volviendo así al inicio del ciclo, haciendo que la respuesta del sistema inmunitario se vaya amplificando cada vez más.

Esta cascada de reacciones inmunitarias produce la eliminación del tumor, excepto en los casos interrumpidos o directamente evitados por mecanismos del tumor (5,7).



**Figura 3. Respuesta del sistema inmunitario ante un tumor.** Este ciclo de reacciones comienza con la muerte de células tumorales y la liberación de antígenos, con cada ciclo la respuesta se verá amplificada, ya que la infiltración de los CTLs es cada vez mayor. Gracias a el se podrá producir la remisión completa del tumor (7).

En 1957, Schreiber propuso la teoría de la inmunoedición tumoral, esta teoría se centra en las tres Ees: Eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, el sistema inmunitario reconoce y destruye a las células tumorales, a esto se le conoce como vigilancia inmunológica; en la fase de equilibrio una pequeña parte de las células tumorales han pasado desapercibidas y se mantienen en equilibrio; por último, tenemos la fase de escape en la que las células tumorales han escapado del sistema inmunitario desarrollando un cáncer y aparecen los síntomas (8).

La fase de equilibrio ocurre debido a que las células tumorales crean un microambiente tumoral (TME) en el que evaden el sistema inmune por los siguientes mecanismos:

- Disminuyendo la expresión de MHC produciendo la reducción o inactivación de la presentación de antígenos tumorales.
- Aumentando la expresión de inhibidores del sistema inmune, por ejemplo, al expresar las células tumorales el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) que se acopla a PD-1 enviando una señal que suprime al sistema inmunitario.
- Secretando citoquinas como TGFβ, adenosina, PEG2, IL-10 y VEGF que inhiben a los linfocitos T citotóxicos.
- Atrayendo células inmunosupresoras como células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), macrófagos M2 y Treg que producen citoquinas inmunosupresoras favoreciendo el tumor e impidiendo la respuesta inmunitaria de las células T (9).

### 3. Inmunoterapia del cáncer

#### 3.1. Historia

A finales del siglo XIX aparecen los primeros ensayos clínicos en los que se utiliza el sistema inmunitario como un tratamiento para el cáncer. En 1891 William Coley, cirujano del Hospital Memorial de Nueva York, tras observar que en algunos pacientes que presentaban infección bacteriana el cáncer remitía, comenzó ensayos clínicos que consistían en la inyección de una combinación de bacterias, conocidas como toxinas de Coley, en el tumor con el fin de activar el sistema inmune y así tratar el cáncer. Se observaron buenos resultados especialmente en sarcomas de huesos y tejidos blandos, mientras que en otros tipos de cáncer no se vieron resultados (4,10).

No fue hasta 2011, que la FDA aprobó el Ipilimumab, un inhibidor del punto de control, para el tratamiento del melanoma. En la actualidad, ya son varios los medicamentos inmunoterapéuticos que han sido aprobados por la FDA y con los cuales se han visto resultados favorables (4,11).

#### 3.2. Tipos de inmunoterapia

La inmunoterapia se encuentra dividida en inmunoterapia pasiva e inmunoterapia activa.

La inmunoterapia pasiva consiste en la infusión de células o anticuerpos tratados en el laboratorio con el fin de combatir el tumor, suelen ser respuestas cortas en el tiempo y por ello la administración deberá ser continuada. Dentro de este tipo de inmunoterapia tenemos:

- Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales nacieron en 1975 de la mano de Cesar Milstein, cuando fusionó un linfocito B con una célula tumoral formándose un hibridoma capaz de secretar un anticuerpo específico, de ahí viene su nombre ya que proviene de un solo clon, este anticuerpo es inmortal en el cultivo por lo que puede ser cultivado para producir muchos anticuerpos (5).

El primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer fue el rituximab utilizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

Este tipo de terapia tiene tres técnicas para combatir el cáncer: por muerte directa por apoptosis, impidiendo el crecimiento celular o por anticuerpos inmunoactivadores, dentro de estos últimos tenemos los que activan la respuesta inmunitaria al reconocer receptores, que van a activar células inmunitarias y, por otro lado, los que activan la respuesta inmunitaria al bloquear señales de bloqueo como pueden ser CTLA-4 o PD-L1.

- Terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

Esta terapia se basa en la extracción de células T del paciente, estas células se modifican genéticamente en el laboratorio para que expresen el receptor CAR, consiguiendo que reconozcan los antígenos tumorales produciendo así una respuesta mas eficaz (5).

En 2017 la FDA aprobó la primera terapia de células CAR-T llamada tisagenlecleucel para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B administrada en pacientes que no responden a la terapia habitual y menores de 25 años (12).

Por otro lado, tenemos la inmunoterapia activa que se basa en estimular el sistema inmunitario para conseguir la respuesta inmune deseada. Al contrario que la pasiva, va a producir una respuesta duradera además de generar memoria. Dentro de este tipo de inmunoterapia se encuentran:

- Vacunas

Las vacunas contra el cáncer pueden estar formadas por células autólogas del tumor, por células dendríticas, por TAA's, por ADN o por vectores de virus. La FDA ha aprobado ya una vacuna contra el virus del papiloma humano.

- Terapia con citoquinas

Mediante la inyección de citoquinas proinflamatorias como IL-2 o IFN- $\gamma$  se vio que estimulaba la respuesta inmunitaria. Debido a que altos niveles de IL-2 hacen que las células T se sobrecarguen y se vuelven mas propensas para atacar a las células tumorales. Esta terapia tuvo una eficacia baja, además de producir efectos no deseados, por ello, se encuentra en desuso (13,14).

- Inhibidores de los puntos de control inmunitarios

La función de estos puntos de control es muy importante para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario, ya que su cometido es evitar que la respuesta del sistema inmune sea desmesurada. Algunos tumores pueden utilizar estos puntos de control para evitar la respuesta del sistema inmunitario. Los más estudiados son PD-1 y CTLA-4.

A. CTLA-4

Es una molécula que regula la activación de las células T, funciona como un inhibidor, que compete con CD28, al unirse CTLA-4 a las células T en lugar de unirse CD28, esto lleva a que se evite la activación de las células T.

B. PD-1

Su función es regular los linfocitos T activados mayormente en los tejidos periféricos, evitando una respuesta exagerada o la autoinmunidad.

Lo que ocurre es que PD-1 se une con su receptor que es PD-L1, pero al ser expresado este receptor por las células tumorales lo que consiguen es la apoptosis de las células T.

Si se bloquean estos puntos de control se va a conseguir que el sistema inmunitario pueda detectar el tumor y así atacarlo. La FDA ha aprobado varios tratamientos con inhibidores de los puntos de control inmunitarios, un ejemplo de ello son la terapia con PD-1 o PD-L1 para el tratamiento del cáncer de pulmón y de melanoma o el ipilimumab, un inhibidor de CTLA-4 para el tratamiento de melanoma metastásico. A pesar de los avances, es un campo que sigue en investigación, además, se están realizando estudios sobre la combinación de varios inhibidores (12).

#### 4. Nanomedicina en inmunoterapia

La nanotecnología es la aplicación de estructuras y moléculas de escala nanométrica entre 1 y 100 nm, cuando se aplica en el campo de la medicina es lo que se conoce por nanomedicina (15).

La nanomedicina tiene unas características que destacan sobre el resto de los tratamientos que hay contra el cáncer, pueden tener propiedades de diagnóstico y terapéuticas, los nanosistemas pueden llevar varios fármacos a la vez pudiéndolo utilizar para terapias combinadas, se pueden direccionar selectivamente a células cancerígenas y también se pueden crear para superar o evitar mecanismos de resistencia (16).

Existen dos mecanismos de orientación al tumor, la orientación activa que se trata de la modificación de la superficie de los nanosistemas mediante ligandos, esto va a hacer que reconozcan específicamente el tejido tumoral y se dirijan a él, mientras que el direccionamiento pasivo debido al efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR) llegan de manera pasiva los nanosistemas al tejido tumoral. Estos dos mecanismos lo que hacen es conseguir una mayor acumulación de nanofármacos en las células tumorales, disminuyendo así la toxicidad (17).

La nanotecnología está compuesta de varias herramientas como son los liposomas, las nanopartículas, las micelas, los nanotubos de carbón y los puntos cuánticos.[16] En el caso de las nanopartículas su estructura debe ser la correcta para conseguir la función deseada, en líneas generales las características que deben tener es que protejan la carga transportada, que tengan una baja toxicidad, una vida media larga, que liberen el contenido en un lugar específico y que sean capaces de atravesar barreras. También habrá que tener en cuenta la forma y el tamaño (8).

La nanomedicina tiene un gran potencial en la inmunoterapia antitumoral, pudiendo disminuir la toxicidad y disminuyendo la resistencia al tratamiento.

#### 5. Modulación del microambiente tumoral mediante nanopartículas

Uno de los problemas observados en la inmunoterapia es que el microambiente tumoral (TME) inhibe la capacidad de reacción del sistema inmunitario provocando el fracaso de muchos tratamientos. Esto sucede debido a distintos tipos de células o citoquinas. De

ahí que, dirigir las terapias a la modulación del TME pueda resultar una gran estrategia para la mejora en la respuesta inmunitaria (18). Dentro del TME se pueden dirigir a:

- **Mediadores celulares**

Los mediadores celulares son un conjunto de sustancias que transmiten información entre células y regulan las funciones celulares.

Se pueden encaminar a células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que tienen función inmunosupresora e inhiben a las células natural killer (NK), se piensa que terapias dirigidas a MDSC podrían aumentar la respuesta a inmunoterapias.

También hacia macrófagos asociados a tumores (TAM) que abundan en el TME, al ser capturados por células tumorales, por un lado, se encuentran los macrófagos clásicamente activados (M1) que son proinflamatorios y buenos en la respuesta antitumoral, y por otro, los macrófagos alternativamente activados (M2) siendo los que predominan en el TME, además son inmunosupresores y favorecen el crecimiento tumoral. Adicionalmente en los TAM se observan pequeñas cantidades de citoquinas inflamatorias como IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, mientras que las cantidades de citoquinas inmunosupresoras como IL-10, TGF- $\beta$  y PGA2 se encuentran aumentadas, todo esto lleva a que se produzca una menor presentación de antígenos asociados a tumores y con ello, una menor estimulación de las células T y NK. En los TAM también se ve una sobreexpresión de receptores de agentes estimulantes de colonias de macrófagos factor I (CSF-1R), estos promueven la metástasis y el crecimiento tumoral, asimismo producen un aumento en la expresión de DC y MDSC, aparte de inhibir los linfocitos T citotóxicos.

Dirigirse a los TAM puede ser una buena estrategia terapéutica.

Otra estrategia es dirigirse a células dendríticas (CD) que se engloban dentro de las células presentadoras de antígeno y maduran con la activación de los receptores tipo toll (TLR), pero en el TME la función de muchas de las CD se ve inhibida, lo que lleva a la activación de las células T reguladoras (Treg) al producir IL-10 en lugar de IL-12. También mencionar la función de las células T reguladoras, que son inmunosupresoras y evitan enfermedades autoinmunes, pero en el TME las células tumorales aumentan su efecto, lo que promueve el crecimiento tumoral y la supresión de células T citotóxicas (CTL), disminuyendo la expresión de CD80/CD86 en las células presentadoras de antígenos y aumentando la producción de IL-10, por tanto, si se disminuye las Treg se verá aumentada la respuesta inmunitaria (19).

- **Mediadores solubles**

Los mediadores solubles son citoquinas implicadas en la diferenciación y maduración celular, la inflamación o la respuesta inmunitaria.

A la hora de regular las células tumorales, la enzimaIDO, que cataliza la degradación de triptófano, es una parte importante ya que controla la tolerancia. La presencia deIDO en el TME produce un secuestro de las células T, inhibiendo así su función, por ello, las terapias dirigidas al silenciamiento deIDO pueden llevar a una mejora en la respuesta antitumoral.

- Puntos de control inmunitarios

Los puntos de control como PD-L1 o CTLA-4 son utilizados por las células tumorales para evadir el sistema inmunitario, por consiguiente, al administrar inhibidores de los puntos de control se potenciará la respuesta del sistema inmunitario.

Pero a pesar de los beneficios de la inmunoterapia aplicada a la modulación del TME, uno de sus grandes inconvenientes es que la gran mayoría de los pacientes no responden a este tipo de tratamientos, aparte de la producción efectos adversos. Por estos motivos, el uso de nanopartículas puede mejorar considerablemente las terapias, dado que, las nanopartículas tienen la capacidad de dirigirse a lugares específicos, disminuyendo así los efectos adversos y además son capaces de conseguir que llegue a lugar de acción una mayor cantidad de carga terapéutica (18,19).

## Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el uso de la nanotecnología en la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.

Siendo los objetivos específicos los siguientes:

- Analizar los problemas que presentan las terapias inmunitarias.
- Identificar hacia donde dirigir las nanopartículas para cambiar el microambiente tumoral.
- Valorar la función de las nanopartículas en la modulación del microambiente tumoral.

## Material y métodos

Para realizar esta revisión bibliográfica se ha hecho un estudio descriptivo rescatando artículos que tratan sobre cómo se ha introducido la nanotecnología para la mejora en la inmunoterapia utilizada en el tratamiento del cáncer.

La información se ha obtenido mediante la consulta en las siguientes bases de datos de ciencias de la salud: Medline utilizando Pubmed, Scopus y Web of Science (WOS).

Para la recuperación de la información se ha utilizado la web de descriptores en ciencias de la salud (DeCS) en donde se han obtenido los Medical Subject Headings (MeSH) que es la terminología adecuada para la búsqueda científica. Los términos que se han utilizado son "Immunotherapy/methods", "Neoplasms/immunology", "Nanostructures/chemistry" y "Nanoparticles/chemistry".

Obteniendo la siguiente ecuación de búsqueda:

```
((("Nanoparticles/chemistry"[Mesh]) OR ("Nanostructures/chemistry"[Mesh])) AND ("Neoplasms/immunology"[MeSH])) AND ("Immunotherapy/methods"[Mesh])
```

Dicha ecuación está diseñada para su uso en la base de datos MEDLINE, vía Pubmed.

Para el resto de las bases de datos se adaptó el formato de la ecuación. Además, se han empleado diversos criterios de inclusión y exclusión.

- Criterios de inclusión:
  - Artículos publicados posteriormente a 2017.
  - Estudio que empleen nanopartículas.
  - Artículos en los que se utilice inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.
  - Publicaciones centradas en el microambiente tumoral.
- Criterios de exclusión:
  - Artículos publicados anteriormente a 2017.
  - Artículos repetidos entre las distintas bases de datos.
  - No poder tener acceso al texto completo.
  - Artículos que no traten sobre el microambiente tumoral.
  - Estudios escritos en idiomas distintos al español o al inglés.

Tras aplicarse los filtros en las distintas bases de datos y los criterios de inclusión y exclusión, se selecciona un total de 12 artículos para el desarrollo de esta revisión.

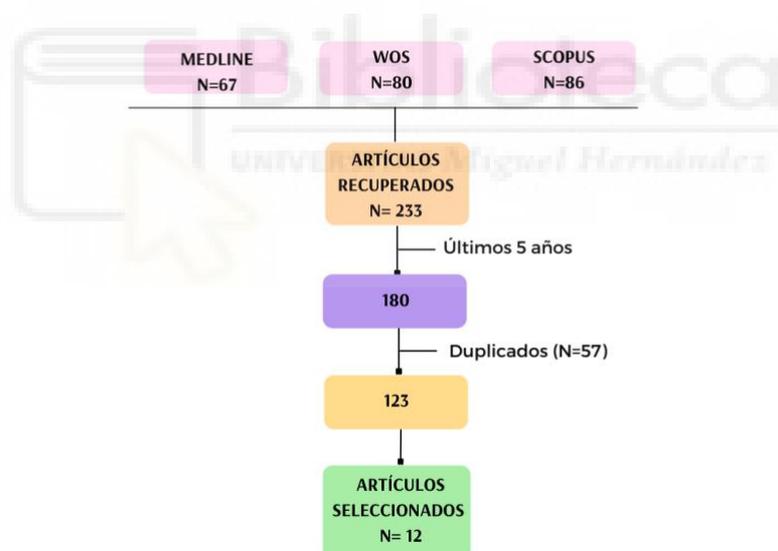


Figura 4. Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica.

## Resultados

Conforme se ha apuntado en la sección anterior, se seleccionaron para un estudio más detallado 12 trabajos relacionados con la mejora en la inmunoterapia mediante el uso de nanopartículas para la modulación del microambiente tumoral. Analizando como estas nanopartículas interactúan con el TME y aumentan la respuesta inmunitaria.

El primer estudio seleccionado fue realizado por Chenghong *et al.* y en él se emplearon nanopartículas de sílice mesoporosa funcional (FMS). La sílice mesoporosa es un

material inorgánico con un diámetro de poro entre 2 y 50 nm, estas nanopartículas de FMS son capaces de controlar la liberación de proteínas atrapadas en ellas en función de los grupos funcionales que tengan. Los anticuerpos se quedan atrapados en la FMS de forma espontánea mediante interacción no covalente, esto ocurre al incubarse FMS en una solución de anticuerpos.

Para conocer la farmacocinética de liberación de FMS se incubaron FMS en una solución de anticuerpos IgG de rata y ratón junto con distintos grupos funcionales (-HOOC, HO3S y NH<sub>2</sub>), a los que se les sometieron a 15 ciclos de agitación, elución y centrifugación, se midieron por densidad de carga de proteínas ( $P_{DL}$ ), que se trata de la cantidad de proteínas de un anticuerpo atrapada en 1 mg de FMS, en la elución 0 se observó que  $P_{DL}$  era mucho más elevada que la de otras proteínas, y tras las 15 eluciones se obtuvo una disminución progresiva de  $P_{DL}$  (20).

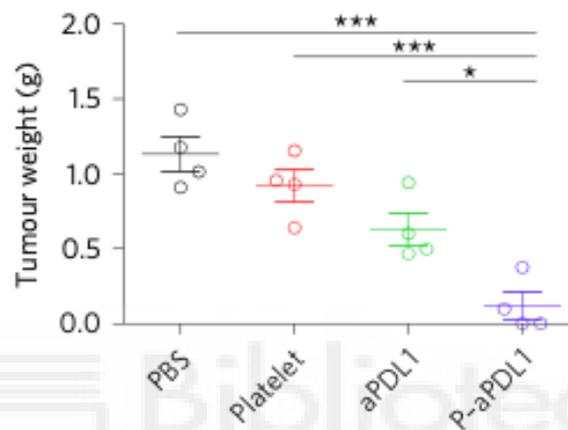
Posteriormente, se utilizaron FMS para atrapar anticuerpos monoclonales (mAb) de rata anti-CTLA-4, con el fin de poderse administrar mayores concentraciones de mAb anti-CTLA-4 y conseguirse una mayor eficacia pero sin aumentar la toxicidad, esta estrategia se probó en un modelo de melanoma murino con tumores de 3 mm, a los que se les inyectó mAb anti-CTLA-4 o mAb anti-CTLA-4 atrapado en FMS, al grupo que se les administró atrapado en FMS se observó después de 34 días una disminución significativa del crecimiento tumoral y no se advirtió ningún signo de toxicidad. Tras ello, se repitió el estudio en un mismo modelo de melanoma murino, se le administró a un grupo IgG de rata atrapado en FMS y a otro grupo FMS-anti-CTLA-4, se obtuvieron resultados similares, al grupo que se le administraron FMS-anti-CTLA-4 se observó de nuevo una reducción del crecimiento tumoral y un aumento de la supervivencia, ya que, cerca del 40% de los ratones sobrevivieron a los 34 días mientras que en el grupo se administraron FMS con IgG de rata, a los 21 días todos se habían muerto, indicando que el efecto era realmente específico y que se daba sólo cuando tanto el mAb anti-CTLA-4 como el FMS estaban presentes (20).

En otro estudio, Wang *et al.* Se basaron en que las plaquetas son capaces de dirigirse a las células tumorales, constituyendo una plataforma para una administración dirigida. Se creó un complejo adhiriendo a la superficie de las plaquetas los anti-PD-L1 (aPD-L1) mediante un enlace de maleimida bifuncional, para evitar modificaciones genéticas. Esto se probó en ratones sanos, a los que se les inyectó en un grupo aPD-L1 solo y en el otro junto con plaquetas (P-aPD-L1), al grupo que se le suministró unidos a plaquetas se observó un notable aumento de la vida media en comparación con aPD-L1 libre. A continuación, se marcaron los anticuerpos con fluorescencia usando Cy5.5, lo que mostró que a los que se le administraron con plaquetas la acumulación era mayor en la herida que cuando se administraron de forma libre.

Posteriormente se experimentó con un modelo murino de melanoma, a los que se les extirpó la mayor parte del tumor quedando un pequeño tumor residual, tras la cirugía se les inyectó por vía intravenosa o una solución salina tamponada con fosfato (PBS), plaquetas, aPD-L1 o P-aPD-L1 para conocer la progresión de los tumores residuales tras la cirugía, mediante observación con bioluminiscencia durante 16 días se visualizó que en el grupo de P-aPD-L1 el tamaño de los tumores era considerablemente pequeño, como se puede apreciar en la figura 5, aparte presentaron una supervivencia del 75% de los ratones después de 60 días, mientras que al grupo que se le inyectó aPD-L1 simplemente se observó un pequeño retraso en el crecimiento tumoral (21).

En este mismo estudio, se empleó otro modelo de ratones con cáncer de mama triple negativo postquirúrgico divididos en 4 grupos, a los cuales se les inyectó PBS, plaquetas, aPD-L1 o P-aPD-L1. Mediante un seguimiento por bioluminiscencia se vio que en el grupo en el que se administró aPD-L1 junto con plaquetas el crecimiento del tumor residual era mínimo y casi no se observó metástasis pulmonar, mientras que en el resto de los grupos se aumentó significativamente el tamaño tumoral y se desarrollaron diversos focos de metástasis a nivel pulmonar. Los únicos ratones que sobrevivieron tras 60 días fueron los del grupo de P-aPD-L1.

Estos resultados indicaron que las plaquetas pueden mejorar la terapia de anti-PD-L1, y puede ser de inspiración para el uso de nanopartículas en otras terapias dirigidas (21).



**Figura 5.** Tamaño de los tumores residuales en el modelo murino de melanoma tras la administración de los distintos tratamientos (21).

En otra investigación realizada por Yoo *et al.* se desarrolló un nanofármaco conjugando una pequeña secuencia de ARN de interferencia (siARN) que actúa inhibiendo la expresión de PD-L1 junto con nanopartículas magnéticas (MN) recubiertas con dextrano, se tratan de nanopartículas de óxido de hierro con un núcleo de hierro superparamagnético que se utiliza como agentes de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética o también para la administración guiada por imágenes, el recubrimiento con dextrano les proporciona estabilidad, aparte de servir como plataforma para entregas dirigidas, a todo el conjunto se le denominó MN-siPD-L1. Se probó en un modelo de cáncer de páncreas murino, cuando el tamaño tumoral alcanzó unos 50 mm<sup>3</sup> se les administró MN-siPD-L1, y al grupo control se le administraron MN-siSCR (siSCR es una pequeña interferencia codificada). En las mediciones que fueron llevadas a cabo se observó en la región de interés que las concentraciones de MN-siPD-L1 aumentan más rápidamente en las 3 primeras semanas y desde la semana 3 hasta la 12 disminuye pero a muy baja velocidad. Al compararlo con el otro grupo control, se vio en éste que hasta la tercera semana aumentaba la concentración, aunque más lentamente, pero que a partir de la semana 3 descendía rápidamente alcanzando concentración 0 alrededor de la semana 5(22).

Después, se empleó esta misma estrategia en otro experimento con un modelo murino de cáncer de páncreas pero en este caso se combinó MN-siPD-L1 con gemcitabina, que es un antineoplásico, a un grupo se le administraron MN-siPD-L1 a dosis bajas, al otro a dosis altas y al grupo control se le inyectaron MN-siSCR junto con gemcitabina, mediante

resonancia magnética se pudo ver que el volumen del tumor apenas había aumentado en el grupo de MN-siPD-L1 y gemcitabina a dosis altas, mientras que en los otros grupos no se observó una inhibición en el crecimiento tumoral que se puede observar en la tabla 1, en los ratones tratados a dosis bajas y en los del grupo control no sobrevivió ninguno a partir de la semana 8, mientras que los del grupo de dosis alta aproximadamente 7 de cada 10 sobrevivió a las 12 semanas. Cabe mencionar que una pequeña proporción del grupo que recibió MN-siPD-L1 y gemcitabina a dosis altas no respondió al tratamiento, mostraron unos resultados similares a los del grupo control (Tabla 1). A nivel de respuesta inmunitaria tras la administración de MN-siPD-L1 con gemcitabina, la expresión de PD-L1 disminuyó y aumentó la de linfocitos CD8+ infiltrantes de tumor, así como la citotoxicidad mediada por células, ya que se vieron disminuidas las concentraciones de células T reguladoras Foxp3+ y aumentadas la granzima B. Aparte de la mejora de la supervivencia y de la disminución del volumen tumoral, la toxicidad y la morbilidad se vieron reducidas gracias a esta combinación (22).

Treatment Group	Tumor growth rate constant (week <sup>-1</sup> )
High-dose MN-siPDL1 + gemcitabine (responder)	0.0813 ± 0.0502
High-dose MN-siPDL1 + gemcitabine (non-responder)	0.5427
Low-dose MN-siPDL1 + gemcitabine	0.3627 ± 0.0866
MN-siSCR + gemcitabine	0.5562 ± 0.24

**Tabla 1.** Tasa del crecimiento constante del tumor por semana en función del tratamiento administrado.

En otro trabajo, Song *et al.* desarrollaron un sistema de nanopartículas lípido-protamina-ADN (LPD) con el que se encapsula el ADN plasmídico que codifica proteínas de fusión de PD-L1. Estas nanopartículas funcionan bloqueando selectivamente PD-L1 en el microambiente tumoral (TME), este sistema se forma, en primer lugar, conjugando el plásmido trampa con protamina, siendo la función de esta la de formar una estructura compacta al unirse al ADN y facilitar la administración a distintas células, forman el complejo plásmido/protamina que se recubre con un liposoma perforado, y por último, se añaden en la superficie los liposomas DSPE-PEG y DSPE-PEG-AEAA utilizados para realizar la administración dirigida de los fármacos. Esta construcción se denominó por los autores LPD-PD-L1 y se inyectó en un modelo de ratones con tumor colorrectal. 48 horas tras la inyección del tratamiento, mediante ELISA se atisbó una acumulación de las proteínas de fusión PD-L1 mayoritariamente en el tumor, sobre todo los días 2 y 4 tras la inyección.

Por otro lado, al modelo de ratones con cáncer colorrectal se les inyectó una combinación de oxaliplatino (OxP) junto con LPD-PD-L1, observándose una gran inhibición del tumor y una supresión tumoral de cerca de un 75% a los 35 días, a diferencia de los grupos a los que se les inyectó OxP libre o solamente las proteínas de fusión PD-L1, en estos apenas se vio inhibido el tumor. Tanto los que habían recibido OxP como los que recibieron OxP junto con LPD-PD-L1, experimentaron un aumento de las células T CD8+ y CD4+, en cambio las células dendríticas activadas solo se vieron aumentadas en el grupo de OxP con LPD-PD-L1 y los niveles de PD-L1 solo aumentaron en el grupo de OxP libre (23).

Por último, en este estudio experimentaron con un modelo de cáncer murino de mama metastásico y otro de melanoma murino, en ellos la terapia de bloqueo de PD-L1 no fue eficaz, pero cuando se combinó con la proteína fusión PD-L1 más Oxp sí que se vio una disminución del volumen tumoral sobre todo en el modelo de cáncer de mama metastásico, no obstante, las concentraciones de células T CD4+ y CD8+ en el tumor aumentan en ambos modelos.

En ninguno de los modelos se observó la expresión de Th17 en el bazo, que está relacionado con patologías autoinmunes.

Este método de administración demostró una baja toxicidad y efectos adversos (23).

En otro de los estudios seleccionados, los mismos autores del estudio anterior (Song *et al.*) formaron un gel inmunomodulador multidominio (iGel) formado por vesículas multinanodominio (MNDV) que consiste en múltiples compartimentos acuosos rodeados por una red de membranas lipídicas, estas MNDV mejoran la eficiencia de la encapsulación, además, este iGel también está formado por fármacos inmunomoduladores encapsulados en nanoliposomas. Por un lado, se inyectó este iGel en un modelo murino de cáncer de mama y otro de cuello uterino ambos postquirúrgicos. Todos los ratones tras la cirugía presentaron tumores residuales, los que no recibieron ningún tratamiento a los 30 días habían fallecido, los que recibieron otros tratamientos prolongaron su vida hasta los 45 días aproximadamente, siendo los únicos que sobrevivieron los que recibieron iGel. En estos ratones se vieron aumentados los niveles de células T CD4+ y CD8+, las natural killer (NK) y además se redujeron las células supresoras mieloides (MDSC), los macrófagos M2 y las células T reguladoras. Elevadas cantidades de estas últimas están asociadas con unos pobres resultados.

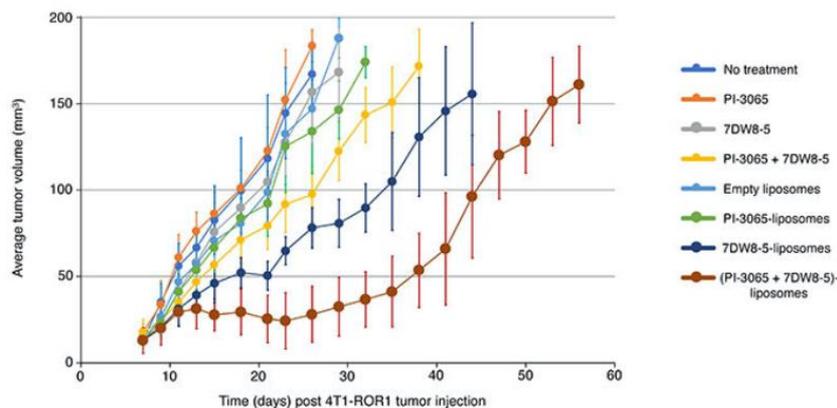
Para comprobar la posibilidad de que el tratamiento local con iGel indujera inmunidad antitumoral sistémica, los autores inocularon al ratón un segundo tumor a la vez que se le trató con iGel, con esto se vio que el tamaño del segundo tumor apenas aumentó, mientras que en los que no recibieron tratamiento el tumor creció rápidamente. En los que se trataron con iGel los niveles de células T CD4+ y CD8+ aumentaron y no se observaron nódulos de metástasis.

En este estudio los autores también quisieron comprobar si se generaban células T memoria, para ello utilizaron ratones que sobrevivieron ante una anteriormente exposición y ratones no expuestos, la presencia de células T memoria en el grupo que administraron anteriormente iGel se encontraban muy por encima a los grupos que recibieron otros tratamientos, en el grupo que ya había estado expuesto el tamaño del tumor no creció hasta el día 20 y no se observó metástasis en ellos, al tiempo que en los no expuestos alrededor del quinto día ya comenzó el crecimiento tumoral. Estos datos les llevaron a pensar que iGel inducía tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa, aparte de reducir la toxicidad (24).

Por otro lado, se utilizó un modelo murino de cáncer de mama y otro de cuello uterino, ambos postquirúrgico en los que se dejaron tumores residuales tras la cirugía, además estos ratones no respondieron anteriormente al tratamiento con inhibidores de puntos de control. En estos modelos se inyectó iGel junto con anticuerpos inhibidores de los puntos de control (anti-PD-L1 ( $\alpha$ PD-L1) y anti-PD-1 ( $\alpha$ PD-1)), se observó una respuesta ante esta combinación, ya que se advirtió un aumento en la expresión de PD-1 en las células T y PD-L1 en células tumorales. En el modelo del cáncer de mama al grupo que se le administró iGel junto  $\alpha$ PD-1 no se observó ningún efecto, sin embargo, cuando se

administró iGel con  $\alpha$ PD-L1 se pudo ver que el 70% de los ratones no presentaban tumores, y que aumentaron las células T CD8+ e IFN- $\gamma$ . En cambio, en el modelo de cáncer de cuello uterino en los que se administró iGel con  $\alpha$ PD-1 aumentó el porcentaje de células T CD8+ e IFN- $\gamma$ , pero cuando se administró iGel junto  $\alpha$ PD-L1 no se vio efecto alguno (24).

Otro de los estudios seleccionados es el realizado por Zhang et al. En este estudio, mediante un modelo de cáncer de mama en ratones, los autores investigaron las ventajas de un portador específico, para ello emplearon dos agentes inmunomodulares, uno fue PI-3065, que es un inhibidor selectivo de quinasa p110 $\delta$  PI3K con actividad contra las células T reguladoras inmunosupresoras y MDSCs, y el otro agente utilizado fue 7DW8-5, un estimulador agonista de las células natural killer invariantes (iNKT). Ambos agentes se encapsularon en nanopartículas lipídicas añadiendo en su superficie péptidos iRGD, se trata de un péptido cíclico de 9 aminoácidos que favorece la acumulación y penetración de fármacos en la zona tumoral. En esta combinación se observó tras su administración una bajada en el crecimiento tumoral que se puede observar en la figura 6 y una disminución en las concentraciones de inmunosupresores en la zona tumoral, así como de los macrófagos asociados a tumores (TAM), MDSC y las células T reguladoras, a la vez que aumentaron las células T CD8+. Estos niveles se mantienen estables hasta 30 días después de la primera inyección, a pesar de que recibieron inyecciones cada 3 semanas. Finalmente generaron resistencia y se observó un aumento en el número de TAM y MDSC, volviéndose inefectivo el tratamiento (25). En este mismo estudio, se repitió el experimento, pero en este caso se administraron PI-3065/7DW8-5 encapsulados en las nanopartículas lipídicas con iRG junto con células CAR-T en un modelo murino de cáncer de mama. Al primer grupo se le administraron primero dichas nanopartículas y después las CAR-T, al segundo grupo se le administraron las CAR-T y seguidamente las nanopartículas, y al tercer grupo que es el grupo control solo se le administraron células CAR-T. Se observó que la infiltración de las células CAR-T en el tumor fueron mucho mayores en el grupo que recibió primero un precondicionamiento con liposomas, en este grupo se erradicó el tumor en la mitad de los ratones y en la otra mitad se vio una regresión del tumor considerable (25).



**Figura 6.** Volumen tumoral en el modelo de cáncer mama dependiendo del tratamiento administrado (25).

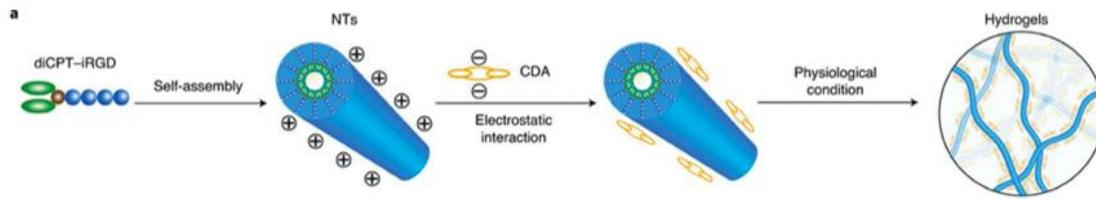
En otro estudio, Wang *et al.* evaluaron los efectos de un hidrogel, este hidrogel fue diseñado mediante la conjugación de dos moléculas de camptotecina (CPT) junto con péptidos iRGD (diCPT-iRG) que se autoensamblaron en nanotubos (NT) supramoleculares, después se les añadió en su superficie mediante interacción electrostática di-AMP cíclico (CDA) cargado negativamente, CDA es un mensajero que activa la respuesta del interferón tipo I (IFN) mediado por STING (estimulador de genes de interferón), esta combinación de los nanotubos autoensamblados con diCPT-iRG y junto con CDA (se denominó CDA-NT) que en condiciones fisiológicas se transforma en hidrogel, esto se puede ver en la figura 7. La administración se llevo a cabo en un modelo murino de tumor cerebral subcutáneo cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron los 100-150 mm<sup>3</sup>. Al grupo control se le administró CDA libre (CDA(L)), cuando se comparo este grupo con el que recibió CDA junto con un hidrogel sin fármaco (E-Gel), la tasa de supervivencia se vio aumentada considerablemente en el grupo que se administró junto con E-Gel.

Después se evaluó el efecto de CDA-NT, se le suministró a un grupo CDA-NT, a otro CDA(L), a un tercer grupo CPT ensamblada en NT con CDA libre y al último grupo una solución salina, el grupo de ratones que recibió CDA-NT fue el único grupo que tuvo una supervivencia del 100%. Al mismo tiempo, en dicho grupo se vio mediante bioluminiscencia una gran inhibición del crecimiento tumoral y después, por citometría de flujo pudieron observar que 10 días después del tratamiento los niveles de células T CD8+ y células T reguladoras estaban significativamente elevadas en comparación con el resto de los grupos. Además, se observó que la administración local de CDA-NT no provocó efectos adversos significantes, ya que, tras realizar varios análisis no se vieron diferencias entre los ratones sanos y los tratados con CDA-NT (26).

También se estudió si el grupo tratado con CDA-NT producía memoria inmunitaria, para ello, utilizaron los ratones supervivientes de los anteriores grupos, y mas aparte, ratones no expuestos anteriormente a ninguna terapia. El día 10 tras la inoculación ya se observó en los ratones no expuestos el desarrollo del tumor, mientras que en los ratones que ya habían estado expuestos anteriormente a los 25 días no se observaron ningún crecimiento tumoral, y al comparar los no expuestos con los grupos que recibieron otros tratamientos la supervivencia también fue mayor, siendo los que presentaron mayor supervivencia los que habían recibido tratamiento con CDA-NT. Cuando se compararon los grupos que habían estado expuestos anteriormente, se observó que los niveles de linfocitos memoria T CD8+, en concreto las células T de memoria central, porque se vieron elevados niveles de los marcadores CD44 y CD62, y las células T de memoria efectora al observar altos niveles de CD44, pero bajos de CD62, estos se encontraron elevados en los que anteriormente habían recibido CDA-NT, lo que sugirió que CDA-NT genera memoria inmunitaria.

Por ultimo, quisieron comprobar el uso de CDA-NT en otros modelos, en el modelo de cáncer de colon murino se vio en el 88% una regresión completa del tumor, en el modelo de cáncer de mama se observó en un 50% regresión tumoral completa y además no se advirtió metástasis en los pulmones, mientras que los que recibieron otros tratamientos si que presentaron nódulos de metástasis pulmonar.

Aparte, se vio que un agotamiento de células T CD8+ disminuía significativamente la eficacia del tratamiento con CDA-NT (26).



**Figura 7.** Esquema de la formación de E-Gel (26).

En otra de las investigaciones seleccionadas realizada por Bahmani *et al.* llevaron a cabo un estudio en el que desarrollaron nanopartículas recubiertas con membranas de plaquetas (PNP), este recubrimiento les confiere características propias de plaquetas como la capacidad de adherirse de manera selectiva a las células tumorales, el PNP se empleó para la administración de un agonista de receptores tipo Toll (TLR) llamado resiquimod (R848), que se trata un inmunomodulador, puesto que produce la liberación de citoquinas como IFN- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 que conducen a la activación de las células presentadores de antígeno (APCs). Para ello, primero estudiaron las interacciones de estas nanopartículas con el tumor, mediante un modelo murino de cáncer al que se les inyectó PNP-R848 y al grupo control se les administró nanopartículas recubiertas con polietilenglicol (PEG-NP), y observaron una mayor retención de PNP-R848 en el tumor que de PEG-NP (27).

Posteriormente, se utilizó un modelo de adenocarcinoma de colon murino, una vez el tumor alcanza un tamaño entre 30-40mm<sup>3</sup> se les administró sacarosa o R848 libre, PEG-NP-R848 o PNP-R848. En el grupo que recibió PNP-R848, se inhibió por completo el crecimiento tumoral y dicho grupo, 30 días después de la administración tuvo una supervivencia del 100% de los ratones, mientras que los grupos que recibieron R848 libre o PEG-NP-R848, únicamente se retrasó el crecimiento tumoral y se observó a los 30 días una supervivencia de alrededor del 25%. En este mismo trabajo y para conocer la inmunidad a lo largo, se sometió a los ratones supervivientes del anterior estudio a una reexposición tres veces mayor, y después de 140 días desde el inicio se le sometió a una segunda exposición 5 veces mayor, lo que mostró que el grupo que recibió PNP-R848 fue en el único que sobrevivió el 100% de los ratones.

Asimismo, después de 7 días tras la administración de PNP-R848 o R848 libre, se extrajo el drenaje de los ganglios linfáticos de ratones con tumores y se vio que al recibir tratamiento con PNP-R848 los niveles de células T CD8+ disminuyeron y aumentaron los linfocitos memoria T CD4+, específicamente los tipos de memoria central, al verse elevados CD44 y CD62 y memoria efectora, al estar aumentada CD44 y disminuida CD62. Al realizar una sección histológica del tumor, se observó que las concentraciones de células T CD8+ y CD4+ estaban aumentadas en el tejido tumoral, esto llevó a erradicar el tumor y a generar células T memoria.

Adicionalmente se utilizó un modelo de cáncer de mama triple negativo murino, cuando el volumen del tumor alcanzó los 30-40 mm<sup>3</sup> se les inyectó R848 libre, PEG-NP-R848 o PNP-R848, administrada cada 2 días un total de 5 veces. En comparación con el grupo control, el grupo que recibió PNP-R848 vio inhibido considerablemente el crecimiento tumoral además de presentar una supervivencia a los 30 días del 15% de los ratones mientras que en el grupo control todos habían muerto a los 9 días. A nivel de metástasis pulmonar en el grupo que recibió PNP-R848 se disminuyó la cantidad de nódulos a una media de 3, siendo la cantidad de nódulos pulmonares en el grupo control de unos 50 (27).

En otro de los trabajos seleccionados, Fang *et al.* desarrollaron una terapia basada en la combinación de hipertermia magnética (MHT), que consiste en nanopartículas magnéticas utilizadas como nanocalentadores para administrar calor a las células tumorales y conseguir así una sensibilización de estas y la generación de efecto citotóxico, pero para la activación de estas nanopartículas es necesario un campo magnético oscilatorio, junto con un sistema de liposomas magnético con péptido modificado TAT, responsable de la internalización celular, y con nanopartículas superparamagnéticas, todo ello para la administración dirigida de inhibidores de los receptores del factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF1R) denominado BLZ945, a todo este conjunto se le llamó TAT- BLZmlips&MHT.

Tras la creación de estos complejos, para conocer los perfiles farmacocinéticos se inyectó en las ratas BLZ945 o TAT- BLZmlips, se vio que la vida media de TAT-BLZmlips era casi 5 veces mayor que la de BLZ945. En otro modelo de cáncer de colon en ratas al que se les administró TAT-BLZmlips con o sin navegación magnética, la navegación magnética consiste en dirigir al fármaco, que en este caso es TAT-BLZmlips, hacia un campo magnético, en el estudio el campo magnético fue generado mediante la colocación de un imán de 8mm en la zona tumoral. Se vio que cuando se administró junto navegación magnética se acumuló en mayor medida alcanzando su punto mas alto a las 6 horas tras la inyección, sin embargo, en el resto de los órganos no se observó diferencias entre los dos grupos (28).

Después, emplearon un modelo de cáncer de colon para experimentar con este complejo. En él, se les administro TAT-BLZmlips&MHT con navegación magnética y se observó una gran inhibición del crecimiento tumoral, si comparamos con TAT-BLZmlips&MHT sin navegación magnética la inhibición fue menor. En este mismo trabajo, los autores estudiaron la expresión de ciertas proteínas mediante Western blot y vieron que en el grupo tratado con BLZmlips&MHT y navegación magnética se vio un aumento de iNOS (es un marcador relacionado con macrófagos clásicamente activados (M1)) y TNF- $\alpha$  (citoquina principal de M1), aparte de una disminución de ARG1 (marcador relacionado con macrófagos alternativamente activados (M2)), estos valores indicaron una repolarización de M2 a M1, que se confirmó cuando al realizar una citometría de flujo advirtieron que la cantidad de M1 había aumentado y M2 había disminuido. Todo esto llevó a que en el grupo tratado con BLZmlips&MHT junto navegación magnética fueran mayores las concentraciones de CD8+ (28).

En la misma línea de modificación del microambiente tumoral, Rao *et al.* desarrollaron una membrana celular modificada genéticamente (gCM), estas membranas sobreexpresaban SIRP $\alpha$  con una afinidad mejorada por CD47, para bloquear la vía de señalización CD47-SIRP $\alpha$  y así favorecer la fagocitosis. Esta gCM se aplicó en un modelo de melanoma murino y vieron un aumento en la fagocitosis de células tumorales, también se mostró un aumento en las células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), además de una mayor expresión de CD80, CD86 y CD103 que llevó pensar que se encontraban en estado maduro, paralelamente observaron una reducción de la cantidad de células T reguladoras, lo que indico una baja inmunosupresión tumoral (29).

En esta misma investigación, también se probaron los efectos de las nanopartículas magnéticas (MN) en un modelo murino de melanoma. En el estudio la citometría de flujo mostró una disminución de M2 y un aumento de M1 en el tumor, al verse

aumentados los niveles de interleucina-12 (IL-12) y disminuida los de interleucina-10 (IL-10) confirmaron que MN promueve la repolarización de M2 a M1.

En base a los anteriores resultados, los autores crearon nanopartículas magnéticas recubiertas de membrana celular modificada genéticamente (gCM-MN) y se administraron en un modelo de melanoma murino, a los otros grupos se les administró PBS, MN o gCM, en el grupo que recibió gCM-MN se vio una inhibición considerable del crecimiento tumoral aunque no completa, y después de 50 días presentaron una supervivencia de cerca del 60%, además en este mismo grupo por citometría de flujo se intuyó una repolarización de M2 a M1, ya que se observó un aumento de M1 y una disminución de M2, más aparte se produjo una fuerte activación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa al verse aumentados los niveles de IFN- $\gamma$  y TFN- $\alpha$ .

Posteriormente, experimentan con gCM-MN en un modelo de cáncer de mama triple negativo en ratones, viendo una gran inhibición del crecimiento tumoral y una supervivencia del 80% a los 50 días. Además, observan una disminución significativa de la metástasis pulmonar reduciéndola casi en un 50%. Por último, cabe mencionar que no se vieron efectos adversos significativos (29).

En otro de los trabajos, Endo *et al.* silenciaron la expresión de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) en las células dendríticas mediante un pequeño ARN de interferencia (siARN) por medio de un nanodispositivo multifuncional de tipo envolvente (MEND) que contiene el lípido YSK12-C4, para la entrega de siARN a células inmunitarias (denominado YSK12-MEND).

Tras el desarrollo de este método, para evaluar su eficacia se probó en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs), primero fue necesario realizar una estimulación con IFN- $\gamma$  para obtener una regulación positiva del gen IDO1 y así poder llevar a cabo su silenciamiento. Una vez realizado este primer paso, se transfectaron las BMDCs con YSK12-MEND, obteniéndose un silenciamiento del 70% a una dosis de siARN de 20  $\mu$ M, esto fue una muestra de que es un método eficiente. Después se comparó con reactivos de transfección disponibles, estos son RNAiMAX y GeneSilencer y se observó que no eran capaces de inducir el silenciamiento de IDO1, también se comparó la capacidad de captación celular, siendo el que presentó mayor captación celular GeneSilencer, pensaron que podía deberse a que tiene un tiempo de incubación mayor (4 horas) mientras que el tiempo de los otros dos es menor (2 horas), también influye el tamaño, de ahí que RNAiMAX tenga una baja captación celular, sin embargo GeneSilencer tiene mayor tamaño que YSK12-MEND y no por ello una mayor captación celular (30).

Posteriormente, los autores investigaron el funcionamiento de las BMDC con YSK12-MEND estimuladas con IFN- $\gamma$  y como grupo control BMDC no tratadas con IFN- $\gamma$ . Los que fueron tratados con IFN- $\gamma$  no presentaron diferencias significativas en los niveles de marcadores de maduración (CD11c, CD40, CD80, CD86 y MHC-II), mientras que en el grupo control los niveles de estos marcadores fueron mínimos, esto es debido a que la maduración de BMDC se produce gracias a IFN- $\gamma$ .

Una vez acabados los ensayos con células, los autores utilizaron un modelo murino de tumor inmunogénico, a los que se les inyectó las BMDC transfectadas con YSK12-MEND, esto produjo una inhibición en el aumento de las células T reguladoras del microambiente tumoral (30).

En el último de los trabajos seleccionados, Shao *et al.*, tras varios fracasos con los inhibidores IDO1, buscaron cuales podían ser las causas de este fracaso y aplicó su método en un modelo de cáncer de esófago. En él, se estudió la relación entre los pacientes con carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC) y la presencia de IDO1. Vieron que los pacientes que tenían una mayor expresión de IDO1 presentaban una supervivencia menor, también se encontraron mayores cantidades de IDO1 en tejidos tumorales que en tejidos normales, y percibieron que en diagnósticos tempranos la expresión de IDO1 era significativamente menor que en diagnósticos tardíos, esto sugirió que IDO1 podría funcionar como un mecanismo de retroalimentación negativa e inhibir las células T (31).

Los autores también se dieron cuenta que la expresión de IDO1 inhibía la muerte celular que produce la terapia con CAR-T. Conociendo esto, desarrollaron nanoláminas para administrar inhibidores de IDO1, para conseguir su silenciamiento y mejorar la terapia con CAR-T. Diseñaron nanopartículas de óxido de grafeno modificado con ácido hialurónico (HA-GO), el uso de óxido de grafeno se debe a que es una adecuada plataforma para la administración de fármacos, mientras que el ácido hialurónico se utiliza para dirigir la terapia hacia las células tumorales y para llevar a cabo una liberación controlada, ya que los receptores de HA se encuentran expresados por las células tumorales, HA-GO se administró junto con inhibidores de IDO1 (IDO1i) lo que produjo un aumento en CAR-T, IFN- $\gamma$  e IL-2.

A continuación, utilizaron un modelo murino de cáncer de esófago, a los que se les inyectó IDO1i o HA-GO-IDO1i, ambos combinados con una terapia de CAR-T y luego al grupo control se le administró solo CAR-T, después de esto se observó que los tratados con HA-GO-IDO1i generaron una considerable inhibición del crecimiento celular, por un lado se vio una reducción de los niveles de PD-1 y TIM3 y por el otro un aumento de CD69, IFN- $\gamma$  e IL-2, estos resultados sugirieron que mediante este método se mejoró la terapia con CAR-T. Además, no se observaron toxicidades producidas por las nanopartículas (31).

A continuación, en la tabla se muestran los principales resultados y características de los trabajos analizados en el presente trabajo de fin de grado.

Dirigido a	Autores	Nanopartículas	Terapia	Modelo	Efectos
Puntos de control inmunitarios	Chenghong et al. (20)	Nanopartículas de sílice mesoporosa (FMS)	mAb anti-CTLA-4	Melanoma murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta la vida media del mAb</li> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 40%</li> </ul>
	Wang et al. (21)	Complejo de plaquetas	Anti-PD-L1	Melanoma murino postquirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta la vida media de anti-PD-L1</li> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 75%</li> </ul>
				Cáncer de mama postquirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Disminución de la metástasis</li> </ul>
	Yoo et al. (22)	Nanopartículas magnéticas (MN) recubiertas con dextrano	ARN de interferencia que inhibe PD-L1 (siPD-L1)	Cáncer de páncreas murino	- Aumenta la vida media de siPD-L1
siPD-L1 + Gemcitabina			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hay un grupo que no responde</li> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 70%</li> </ul> A nivel inmunitario:		

					<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+ y granzima B</li> <li>- Disminución de Treg y PD-L1</li> </ul>
	Song et al. (23)	Nanopartículas lípido-protamina-ADN	ADN que codifica proteínas fusión de PD-L1 + Oxaliplatino	Tumor colorrectal murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumentan las concentraciones en el tumor de la proteína fusión PD-L1</li> <li>- Diminución crecimiento tumoral</li> </ul> A nivel inmunitario: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+, CD4+ y CD</li> </ul>
				Cáncer murino de mama y melanoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminución crecimiento tumoral</li> </ul> A nivel inmunitario: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+ y CD4+</li> </ul>
	Song et al. (24)	Gel inmunomodulador multidominio (iGel)	Anti-PD-L1 ( $\alpha$ -PD-L1) o anti-PD-1 ( $\alpha$ -PD-1)	Cáncer de mama murino postquirúrgico	Utilizando $\alpha$ -PD-L1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminución crecimiento tumoral</li> </ul> A nivel inmunitario: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+ e IFN-<math>\gamma</math></li> </ul>
				Cáncer de cuello uterino murino postquirúrgico	Utilizando $\alpha$ -PD-1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminución crecimiento tumoral</li> </ul>

					A nivel inmunitario: - Aumento de CD8+ e IFN- $\gamma$
Mediadores celulares	Song et al. (24)	Gel inmunomodulador multidominio (iGel)	Fármacos inmunomoduladores	Cáncer de mama murino postquirúrgico	- Disminución crecimiento tumoral - Supervivencia del 80% A nivel inmunitario: - Aumento de CD8+, CD4+ y NK - Disminución de Treg, MDSC y M2 Y no se observa metástasis
				Cáncer de cuello uterino murino postquirúrgico	- Menor disminución crecimiento tumoral - Supervivencia del 15% A nivel inmunitario: - Aumento de CD8+, CD4+ y NK - Disminución de Treg, MDSC y M2
				Reexposición	-Retraso del crecimiento tumoral

					<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presencia de células T memoria</li> <li>- No se observa metástasis</li> </ul>
	Zhang et al. (25)	Nanopartículas lipídicas + iRGD	Dos agentes inmunomoduladores	Cáncer mama murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>A nivel inmunitario:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+</li> <li>- Disminución de Treg, MDSC y TAM</li> </ul> </li> <li>(Después de 30 días se genera resistencia)</li> </ul>
	Wang et al. (26)	E-Gel	Agente estimulador del gen interferón (STING)	Tumor cerebral murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 100%</li> <li>A nivel inmunitario:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+ y Treg</li> </ul> </li> </ul>
				Cáncer mama y de colon murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- No se observa metástasis</li> </ul>
				Reexposición	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No se observa crecimiento tumoral</li> <li>- Aumento de células T CD8+ memoria</li> </ul>

	Bahmani et al. (27)	Nanopartículas recubiertas con membranas de plaquetas (PNP)	Resiquimod (R848)	Cáncer colon murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de concentración de R848 en el tumor</li> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 100%</li> </ul> A nivel inmunitario: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+, CD4+ y NK</li> </ul>
				Cáncer de mama murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 15%</li> <li>- Reducción de nódulos de metástasis</li> </ul>
				Reexposición	- Aumento de células T memoria
	Fang et al. (28)	TAT-mlips&MHT con navegación magnética	Factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF-1) (BLZ945)	Cáncer de colon murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de la vida media de BLZ945</li> <li>- Aumento de concentración en el tumor de BLZ945</li> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 100%</li> </ul>

					<p>A nivel inmunitario:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD8+</li> <li>- Repolarización de M2 a M1</li> </ul>
	Rao et al. (29)	Membrana celular modificada genéticamente (gCM) junto MN	Anti-CD47	Melanoma murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 60%</li> </ul> <p>A nivel inmunitario:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de CD80, CD86, CD103, CD, IL-12 y M1</li> <li>- Disminución de Treg, IL-10 y M2</li> <li>- Repolarización de M2 a M1</li> </ul>
				Cáncer de mama murino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Supervivencia del 80%</li> <li>- Disminución del 50% de la metástasis</li> </ul>
Mediadores solubles	Endo et al. (30)	Nanodispositivo multifuncional envolvente (MEND) con lípido YSK12	siARN que silencia la expresión de IDO1	Tumor inmunogénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución crecimiento tumoral</li> <li>- Disminución expresión de IDO1</li> </ul>

	Shao et al. (31)	Nanopartículas de óxido de grafeno modificadas con ácido hialurónico (HA-GO)	Inhibidores de IDO1	Cáncer de esófago murino	- Disminución de Treg - Disminución crecimiento tumoral - Disminución expresión de IDO1 -Aumento de CAR-T, IFN- $\gamma$ e IL-2
			+ Terapia con CAR-T		- Disminución crecimiento tumoral - Disminución expresión de IDO1 -Aumento de CD69, IFN- $\gamma$ e IL-2 - Disminución PD-1 y TIM3

**Tabla 2.** Resumen de los 12 estudios seleccionados.

## Discusión

La revisión elaborada expone la existencia de investigaciones que muestran el valor de la aplicación de nanopartículas dirigidas a la modulación del microambiente tumoral, ya que, si se actúa sobre el microambiente tumoral se consigue una mejor respuesta ante distintas terapias, para ello se emplean nanopartículas capaces de realizar administraciones dirigidas de fármacos, facilitar el seguimiento, reducir las toxicidades o evitar la degradación del fármaco.

Los sistemas de nanopartículas empleados en estas investigaciones se pueden dividir en dirigidas a puntos de control inmunitarios, a mediadores solubles o a mediadores celulares.

A continuación se pasa a discutir los resultados obtenidos agrupándolos por el tipo de estrategia empleada.

### Dirigido a puntos de control inmunitarios

Dirigiendo las terapias a la inhibición de puntos de control como PD-L1 o CTLA-4 se puede conseguir modificar el microambiente y, por tanto, mejorar la respuesta inmunitaria.

Se ha visto que el uso de estos inhibidores de los puntos de control, en concreto anti-CTLA-4, anti-PD-L1 y anti-PD-1, aumentan la vida media del fármaco y su acumulación en la zona tumoral. Estas combinaciones modulan el microambiente tumoral y por consiguiente la respuesta inmunitaria.

De todos los ensayos dirigidos a inhibidores de los puntos de control, el estudio que mayor supervivencia presenta es el que emplea complejos de plaquetas recubiertas con anti-PD-L1, que, a su vez son también los que consiguen una mayor inhibición del crecimiento tumoral (21).

Por un lado, los resultados observados manifiestan que la respuesta inmunitaria deseada se obtiene con la combinación de las nanopartículas junto con los inhibidores de los puntos de control. Sin embargo, la utilización de estas terapias de manera individual no favorece la mejora terapéutica.

Por otro lado, también se ve en las investigaciones que emplean MN, LPD e iGel una mejora en la respuesta a tratamientos antineoplásicos como la gemcitabina o el oxaliplatino (22, 23, 24).

No obstante, en la investigación que combina gemcitabina a dosis altas con MN recubiertas de dextrano junto siPD-L1, no se observa inhibición en el crecimiento tumoral ni modulación del microambiente tumoral y por tanto tampoco una respuesta ante el tratamiento (22).

Dentro de una misma investigación en la que se emplean nanopartículas lípido-protamina-ADN con proteínas de fusión PD-L1, se observa un mayor porcentaje de CD4+ y CD8+ en el modelo murino de melanoma que en el de cáncer de mama (23).

Por último, en todos los estudios dirigidos a inhibidores de puntos de control se ve un incremento en la respuesta inmunitaria, puesto que hay un aumento de la expresión de CD8+ y CD4+ en la zona tumoral, en concreto se observa un mayor aumento de estos linfocitos en el estudio que emplean iGel junto PD-L1 probado en un cáncer de mama murino postquirúrgico (24).

### Dirigido a mediadores celulares

Dirigir las terapias hacia la disminución de mediadores celulares como pueden ser los TAM, las TAF y las MDSC puede mejorar la respuesta inmunitaria.

Con respecto al uso nanopartículas dirigidas a mediadores celulares como pueden ser los TAM, las MDSC y los TAF, se ha constatado que la disminución de estos provoca una mejora de la respuesta inmunitaria ante el cáncer. Dentro de los estudios que emplean este direccionamiento el que consigue un mayor descenso en la expresión de estos mediadores es el que utiliza nanopartículas lipídicas con iRGD y dos agentes inmunomoduladores, no obstante, tiene un efecto durante un tiempo limitado, puesto que se desarrolla resistencia contra la terapia (25).

En cuanto al tamaño tumoral, todas las estrategias empleadas reducen el crecimiento en mayor o menor medida, de hecho, el estudio que presenta una mayor reducción es el que prueba en un modelo murino de colón nanopartículas recubiertas con membranas de plaquetas (PNP) junto con resiquimod, mientras que, el que presenta una menor inhibición del crecimiento tumoral es el estudio que emplea iGel con fármacos inmunomoduladores en un modelo murino de cáncer de cuello uterino. De forma similar, si comparamos los estudios basándonos en su supervivencia, tanto los que utilizan PNP junto con resiquimod como los que emplean MHT con un sistema de liposomas magnético con péptido TAT junto CSFR1 y mediante navegación magnética, obtienen el mayor porcentaje de supervivientes (24, 27).

A su vez, se ha analizado que el uso de E-Gel e iGel reduce o incluso inhibe los nódulos de metástasis pulmonar de los modelos murinos de cáncer de mama (24, 26).

Para concluir con este apartado, se constata tras la reexposición a tumores la formación de células memoria en los grupos anteriormente tratados, en concreto se ve una mayor respuesta ante la reexposición en el ensayo que utiliza E-Gel junto con un agente estimulante de genes de interferón (STING) (26).

### Dirigidos a mediadores solubles

Dirigiendo las terapias a citoquinas como la enzima IDO, para la remodelación del microambiente tumoral, lo que conlleva la mejora de la respuesta inmunitaria.

Se conoce que la expresión elevada de IDO1 en los tumores es signo de menor respuesta al tratamiento, y por ello, una menor supervivencia y un peor pronóstico. En las dos investigaciones incluidas en el trabajo, se observa ante el silenciamiento de IDO una disminución del crecimiento tumoral similar en ambas (30, 31).

Por una parte, se ocasiona una mayor infiltración celular del fármaco en el estudio en el que se administran inhibidores de IDO1 en nanopartículas de óxido de grafeno

modificadas con ácido hialurónico (HA-GO), además, al combinarlas con la terapia CAR-T, se produce una mejora en la respuesta terapéutica al evitar la inhibición de las células CAR-T (31).

Por otra parte, en la investigación que emplea un nanodispositivo multifuncional envolvente (MEND) con lípido YSK12-C4 para la administración de siARN demuestra que es un método eficiente para terapias dirigidas a IDO1, pero adicionalmente se ha visto que también puede emplearse como método para reducir las células T reguladoras y PD-1 (30).

## Conclusión

En definitiva, se ha demostrado que uno de los problemas de la inmunoterapia es la falta de respuesta debida al microambiente tumoral. Por ello, la importancia de actuar sobre el microambiente tumoral para la mejora de terapias inmunitarias en el tratamiento del cáncer.

A la hora de modular el microambiente tumoral se ha visto la necesidad de emplear nanopartículas para alcanzar mayor respuesta inmunitaria, disminuir toxicidades, aumentar la vida media de los fármacos, realizar administraciones dirigidas o incluso para hacer un seguimiento. Estas nanopartículas para la remodelación del microambiente deben de estar dirigidas hacia puntos de control inmunitarios, mediadores solubles y mediadores celulares.

Se han distinguido mejoras terapéuticas en los distintos modelos murinos de cáncer después de la administración de nanopartículas junto con tratamientos inmunoterapéuticos.

A pesar de ello, esto no significa que dichos métodos vayan a ser eficaces una vez traducidos a humanos, ya que, se tratan de estudios preclínicos realizados en ratones, lo supone una limitación a la hora de traducir los hallazgos a humanos, puesto que existe una gran dificultad en el desarrollo de modelos animales representativos del cáncer en humanos. Serán pues necesarios nuevos estudios que permitan abordar con garantías el paso a ensayos clínicos que confirmen si estas estrategias son o no efectivas.

## Bibliografía

1. [Organización Mundial de la Salud.](#)
2. [International Agency for Research on Cancer.](#)
3. [International Agency for Research on Cancer.](#)
4. Antón A editor. Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer. España: Amazing Books; 2018.

5. Markovic SN. The Basics of Cancer Immunotherapy. Minnesota: Springer; 2018.
6. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
7. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. Vol. 39, *Immunity*. 2013. p. 1–10.
8. López ÁG, Seoane JM, Sanjuán MAF. Dynamics of the cell-mediated immune response to tumour growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2017 Jun 28;375(2096).
9. Li Y, Ayala-Orozco C, Rauta PR, Krishnan S. The application of nanotechnology in enhancing immunotherapy for cancer treatment: Current effects and perspective. Vol. 11, *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry; 2019. p. 17157–78.
10. Edward F. McCarthy. The toxins of william b. coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcoma. *Lowa Orthop J*. 2006;26:154–8.
11. Sun Q, Barz M, de Geest BG, Diken M, Hennink WE, Kiessling F, et al. Nanomedicine and macroscale materials in immuno-oncology. Vol. 48, *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry; 2019. p. 351–81.
12. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. Vol. 35, *Seminars in Oncology Nursing*. Elsevier Inc; 2019.
13. Bockamp E, Rosigkeit S, Siegl D, Schuppan D. Nano-Enhanced Cancer Immunotherapy: Immunology Encounters Nanotechnology. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
14. 14. Ledford H. Cancer treatment: The killer within. *Nature*. *Nature*. 2014;508:24–6.
15. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. Vol. 25, *Molecules*. MDPI AG; 2020.
16. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. Vol. 15, *Drug Discovery Today*. 2010. p. 842–50.
17. Shi Y, Lammers T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. *Accounts of Chemical Research*. 2019 Jun 18;52(6):1543–54.
18. Musetti S, Huang L. Nanoparticle-Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment to Enhance Immunotherapy. Vol. 12, *ACS Nano*. American Chemical Society; 2018. p. 11740–55.
19. Song W, Musetti SN, Huang L. Nanomaterials for cancer immunotherapy. Vol. 148, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2017. p. 16–30.
20. Lei C, Liu P, Chen B, Mao Y, Engelmann H, Shin Y, et al. Local release of highly loaded antibodies from functionalized nanoporous support for cancer immunotherapy. *J Am Chem Soc*. 2010 May 26;132(20):6906–7.
21. Wang C, Sun W, Ye Y, Hu Q, Bomba HN, Gu Z. In situ activation of platelets with checkpoint inhibitors for post-surgical cancer immunotherapy. *Nature Biomedical Engineering*. 2017 Feb 10;1(2).

22. Yoo B, Jordan VC, Sheedy P, Billig AM, Ross A, Pantazopoulos P, et al. RNAi-Mediated PD-L1 Inhibition for Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1).
23. Song W, Shen L, Wang Y, Liu Q, Goodwin TJ, Li J, et al. Synergistic and low adverse effect cancer immunotherapy by immunogenic chemotherapy and locally expressed PD-L1 trap. *Nature Communications*. 2018 Dec 1;9(1).
24. Song C, Phuengkham H, Kim YS, Dinh VV, Lee I, Shin IW, et al. Syringeable immunotherapeutic nanogel reshapes tumor microenvironment and prevents tumor metastasis and recurrence. *Nature Communications*. 2019 Dec 1;10(1).
25. Zhang F, Stephan SB, Ene CI, Smith TT, Holland EC, Stephan MT. Nanoparticles that reshape the tumor milieu create a therapeutic window for effective t-cell therapy in solid malignancies. *Cancer Research*. 2018 Jul 1;78(13):3718–30.
26. Wang F, Su H, Xu D, Dai W, Zhang W, Wang Z, et al. Tumour sensitization via the extended intratumoural release of a STING agonist and camptothecin from a self-assembled hydrogel. *Nature Biomedical Engineering*. 2020 Nov 1;4(11):1090–101.
27. Bahmani B, Gong H, Luk BT, Haushalter KJ, DeTeresa E, Previti M, et al. Intratumoral immunotherapy using platelet-cloaked nanoparticles enhances antitumor immunity in solid tumors. *Nature Communications*. 2021 Dec 1;12(1).
28. Fang Y, He Y, Wu C, Zhang M, Gu Z, Zhang J, et al. Magnetism-mediated targeting hyperthermia immunotherapy in “cold” tumor with CSF1R inhibitor. *Theranostics*. 2021;11(14):6860–72.
29. Rao L, Zhao SK, Wen C, Tian R, Lin L, Cai B, et al. Activating Macrophage-Mediated Cancer Immunotherapy by Genetically Edited Nanoparticles. *Advanced Materials*. 2020 Nov 1;32(47).
30. Endo R, Nakamura T, Kawakami K, Sato Y, Harashima H. The silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in dendritic cells by siRNA-loaded lipid nanoparticles enhances cell-based cancer immunotherapy. *Sci Rep*. 2019 Aug 5;9(1):11335.
31. Shao J, Hou L, Liu J, Liu Y, Ning J, Zhao Q, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Inhibitor-Loaded Nanosheets Enhance CAR-T Cell Function in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Immunology*. 2021 Mar 22;12.